Série A, n° 4511
N° d'ordre : 5358

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

par

Roger MARTOJA

1re THÈSE

Sur quelques aspects de la biologie des Orthoptères en relation avec la présence de concentrations microbiennes *(bactéries intestinales, rickettsies)*

2e THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Un type particulier d'appareil génital chez les Insectes : les ovarioles adénomorphes du Coléoptère *Steraspis speciosa* (Buprestidae)

Soutenues le 5 janvier 1966 *devant la Commission d'Examen.*

M. GRASSÉ.....	*Président*
Mlle COUSIN.....	*Examinateurs*
M. GABE	

PARIS
LIBRAIRIE LE FRANÇOIS, 19, BOULEVARD SAINT-GERMAIN
1965

EXTRAIT DES ANNALES DE LA SOCIÉTÉ ENTOMOLOGIQUE DE FRANCE (N.S.), II (5), 1966

Série A, n° 4 511
N° d'ordre : 5 358

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

par

Roger MARTOJA

1re THÈSE

Sur quelques aspects de la biologie des Orthoptères en relation avec la présence de concentrations microbiennes *(bactéries intestinales, rickettsies)*

2e THÈSE

Propositions données par la Faculté

Un type particulier d'appareil génital chez les Insectes : les ovarioles adénomorphes du Coléoptère *Steraspis speciosa* (Buprestidae)

Soutenues le 5 janvier 1966 *devant la Commission d'Examen.*

M. GRASSÉ..... *Président*
Mlle COUSIN..... } *Examinateurs*
M. GABE ..... }

PARIS
LIBRAIRIE LE FRANÇOIS, 19, BOULEVARD SAINT-GERMAIN
1965

Extrait des Annales de la Société Entomologique de France (N.S.), II, (5), 1966

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41533909_0022

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen . . . . . M. ZAMANSKY

BRELOT ..... T Analyse supérieure.
PRENANT ..... T Anatomie et Histologie comparée.
GRASSE ..... T Évolution des êtres organisés.
PRÉVOST ..... T Chimie organique.
WYART ..... T Minéralogie et Cristallographie.
TEISSIER ..... T Zoologie.
MANGENOT ..... T Biologie végétale (Orsay).
AUGER ..... T Physique quantique et Relativité.
MONNIER ..... T Physiologie générale.
PIVETEAU ..... T Paléontologie.
ROCARD ..... T Physique (E.N.S.).
CARTAN ..... T Mathématiques (E.N.S.).
LAFFITTE ..... T Chimie générale.
N..... T Géométrie supérieure.
COULOMB ..... T Physique du globe.
Mlle COUSIN ..... T Biologie animale (S.P.C.N.).
CHRÉTIEN ..... T Chimie minérale.
BOCQUET ..... T Zoologie.
KASTLER ..... T Physique (E.N.S.).
EPHRUSSI..... T Génétique.
RIVIÈRE ..... T Géologie (S.P.C.N.) et Sédimentologie (Orsay).
GAUTHERET ..... T Biologie végétale (P.C.B.).
LUCAS (R.) ..... T Recherches physiques.
THOMAS (A.) ..... T Biologie cellulaire.
ARNULF ..... T Optique appliquée.
MORAND..... T Physique Enseignement.
SOLEILLET ..... T Physique (P.C.B.).
FORTIER ..... T Mécanique expérimentale des fluides.
DRACH..... T Zoologie.
QUENEY ..... T Météorologie et Dynamique atmosphérique.
GALLIEN..... T Embryologie.
EICHORN ..... T Botanique.
DE CUGNAC..... T Biologie végétale (S.P.C.N.).
Mlle GAUCHOIS ... T Chimie Physique.
CHAMPETIER ..... T Chimie macromoléculaire.
CUVILLIER ..... T Micropaléontologie.
JUNG..... T Géologie.
TRILLAT ..... T Microscopie et Diffraction électronique.
WIEMANN..... T Chimie organique et structurale.
JACQUINOT ..... T Spectroscopie et Physique céleste (Orsay).
VASSY ..... T Physique de l'atmosphère.
DESTOUCHES..... T Théories physiques.
AMIEL..... T Chimie générale.
HOCART ..... T Minéralogie et Cristallographie.
J.-P. MATHIEU .... T Physique (optique).
COUTEAUX ..... T Cytologie.
MAY ..... T Zoologie.
CHOQUET..... T Théorie des fonctions et Topologie.
FELDMANN ..... T Biologie végétale marine.
GUINIER ..... T Physique des solides (Orsay).
JOST..... T Physiologie comparée.
FORTET..... T Calcul des Probabilités et Physique mathématiques.
SCHWARTZ..... T Calcul différentiel et intégral.
CHOUARD ..... T Physiologie végétale.
MALAVARD ..... T Aviation (technique aéronautique).
NORMANT..... T Synthèse organique.
BENARD ..... T Chimie minérale.
BUVAT..... T Botanique (E.N.S.).
DUGUE..... T Statistiques mathématiques.
SOULAIRAC ..... T Psychophysiologie.
ULRICH ..... T Physiologie végétale appliquée.
MARÉCHAL ..... T Optique théorique et appliquée.
KIRRMANN ..... T Théories chimiques.
CHADEFAUD ..... T Botanique.
Mlle LE BRETON... T Physiologie de la nutrition.
LELONG ..... T Application de l'analyse à la Géométrie.
THELLIER ..... T Physique du globe.
L'HÉRITIER ..... T Biologie générale (Orsay).
GRIVET ..... T Radioélectricité (Orsay).
PONCIN..... T Mécanique générale.
DUBREIL..... T Arithmétique et Théorie des nombres.
QUELET..... T Chimie organique.
CAGNIARD ..... T Géophysique appliquée.
LENNUIER..... T Physique (M.G.P.).
RIZET..... T Génétique (Orsay).
ROUTHIER..... T Géologie appliquée.
Mme TONNELAT .. T Physique théorique.
DIXMIER..... T Mathématiques (M.P.C.).
SOUCHAY ..... T Chimie générale.
AIGRAIN ..... T Électrotechnique générale.
BRUSSET..... T Chimie systématique.
M. LÉVY ..... T Physique théorique des hautes énergies (Orsay).
Mme CHAIX..... T Chimie biologique.
Mme HUREL-PY ... T Biologie végétale (P.C.B.).
PANNETIER ..... T Chimie générale.
BRUN ..... T Mécanique des fluides I.
LEDERER..... T Chimie biologique (Orsay).
Mme DUBREIL..... T Mathématiques (agrégat.).
Mme LELONG..... T Mathématiques II (E.N.S.).
BELLAIR..... T Géologie (S.P.C.N.).
COTTE..... T Physique électricité.
DUBOIS (J.-E.) .... T Chimie organique.
LAMOTTE..... T Zoologie (E.N.S.).
MICHEL (A.)..... T Chimie minérale (Orsay).
OLMER..... T Énergétique générale.
ROUAULT ..... T Électricité (Orsay).
GAUTHIER ..... T Mécanique appliquée.
BARCHEWITZ ..... T Chimie physique.
BROSSEL..... T Physique atomique.
BUSER ..... T Physiologie comparée.
CAMUS ..... T Physiologie végétale.
CASTAING ..... T Physique II Thermo (Orsay).
CURIEN..... T Minéralogie et Cristallographie.
MOYSE..... T Physiologie végétale (Orsay).
Mme CHARNIAUX-COTTON..... T Évolution des êtres organisés.
POSSOMPES ..... T Zoologie.
PULLMANN ..... T Chimie quantique.
TEILLAC ..... T Physique nucléaire et Radioactivité (Orsay).
TONNELAT ..... T Biologie Physicochimique (Orsay).
VILLE ..... T Économétrie.
WILLEMART ..... T Chimie (P.C.B.).
DODE ..... T Chimie (Orsay).
FREYMANN ..... T Recherches physiques.
GUINOCHET..... T Biologie végétale (S.P.C.N.) (Orsay).
DEVILLERS..... T Anatomie et Histologie comparée.
EHRESMANN ..... T Topologie algébrique.
FRANCON..... T Physique (S.P.C.N.).
GLANGEAUD ..... T Géographie physique et Géologie dynamique.
DODFMENT..... T Mathématiques (M.G.P.).
PISOT ..... T Technique mathématique de la Physique.
ROCH ..... T Géologie.
SCHATZMANN ..... T Astrophysique.
TERMIER..... T Géologie générale.
ZAMANSKY ..... T Mathématiques générales.
LUCAS..... T Géologie.
ALLARD ..... T Chimie physique.
BERTHELOT..... T Physique des particules fondamentales (Orsay).
BRICARD ..... T Météorologie et physique de l'atmosphère.
Mme ALBE FESSARD T Psychophysiologie.

Friedel	T	Physique des solides (Orsay).
Julia M.	T	Études des moléculaires complexes.
Lender	T	Biologie animale (S.P.C.N.) (Orsay).
Magat	T	Physicochimie des radioéléments.
Mlle Quintin	T	Électrochimie.
Monod	T	Chimie du métabolisme.
Benoit	T	Physio-animale (Orsay).
De Possel	T	Analyse numérique.
Charlot	T	Chimie analytique.
Lemée	T	Écologie végétale (Orsay).
Guérin	T	Chimie (M.P.C.) (Orsay).
Chatelet	T	Chimie (P.C.B.).
Jean	T	Physique nucléaire (Orsay).
Mattler	T	Physique (S.P.C.N.).
Bergerard	T	Zoologie (Orsay).
Bertein	T	Électronique (Orsay).
Bouissières	T	Radiochimie.
Mme Couture	T	Thermodynamique et mécanique physique.
Ellemberger	T	Géologie des grandes régions du globe (Orsay).
Franc	T	Biologie animale (P.C.B.).
Schnell	T	Botanique tropicale.
Stolkowski	T	Physiologie végétale.
Acher	T	Chimie biologique.
Baudoin	T	Biologie animale (P.C.B.).
Beaumont		Biologie animale (S.P.C.N.).
Blamont	T	Géophysique ionosphère.
Boureau	T	Botanique.
Curie D.	T	Physique (M.G.P.).
Durand-Delga	T	Géologie.
Fréon	T	Chimie organique (Orsay).
Rollet	T	Chimie minérale.
Mlle Josien	T	Chimie (S.P.C.N.).
Chevalley	T	Géométrie algébrique et Théorie des groupes.
Arnoult	T	Électronique (Orsay).
Chapelle	T	Physique I (Orsay).
Delange	T	Mathématiques I (Orsay).
Deny	T	Mathématiques générales (Orsay).
Germain	T	Mécanique théorique des fluides.
Lacombe	T	Métallurgie des métaux nucléaires (Orsay).
Brochard	T	Physique (P.C.B.) (Orsay).
Cabannes	T	Mécanique générale.
Lesieur	T	Mathématiques I (Orsay).
Mazet	T	Mécanique générale (Orsay).
Caire		Géographie physique et Géologie dynamique.
Comolet		Mécanique des fluides.
Corabœuf	T	Physiologie animale (Orsay).
Delloue	T	Physique de l'exosphère.
Gorenflot		Botanique II (Orsay).
Houillon		Biologie animale (P.C.B.).
Jullien J.		Chimie (S.P.C.N.) (Orsay).
Malgrange	T	Technique mathématique de la Physique (Orsay).
Olivier		Anthropologie.
Nozeran	T	Botanique II (Orsay).
Blanc-Lapierre	T	Physique (E.N.S.) (Orsay).
Chevaugeon	T	Botanique (Orsay).
Kahane	T	Mathématiques (Orsay).
Samuel	T	Mathématiques (E.N.S.) féminines.
Kourganoff	T	Astronomie (Orsay).
Thiry	T	Mécanique céleste.
Abeles		Physique (S.P.C.N.).
Amat	T	Physique (P.C.B.).
Auboin	T	Géologie.
Mme Benoit-Gueutal	T	Physique nucléaire et Radioactivité (Orsay).
Bougis		Biologie marine (Villefranche-sur-Mer).
Bruhat	T	Mathématiques (M.P.C.).
Brunn	T	Géologie historique (Orsay).
Chabbal	T	Physique (M.G.P.) (Orsay).
Deheuvels	T	Mathématiques Propédeutique (Orsay).
D'Espagnat	T	Physique théorique (Orsay).
Furon	T	Géologie (S.P.C.N.).
Mme Gans	T	Génétique.
Geneves		Biologie végétale (P.C.B.).
Guilbert		Physique (C.U.S. Orléans).
Hupe	T	Pétrographie.
Hollande	T	Biologie générale.
Lions	T	Analyse numérique.
Heller	T	Physiologie végétale.
Tortrat	T	Calcul des probabilités.
Cailleux	T	Géologie (S.P.C.N.).
Magnan		Physique Électricité.
Daudel	T	Mécanique ondulatoire appliquée à la chimie théorique et à la Physique nucléaire.
Mlle Fourcroy		Biologie végétale (S.P.C.N.).
Mme Choquet-Bruhat.		Mécanique analytique et Mécanique céleste.
Mlle Veil	T	Physiologie générale.
Lwoff	T	Microbiologie.
Siestrunck	T	Mécanique physique et expérimentale.
Néron	T	Mathématiques (M.P.C.) (Orsay).
Mme Peckerwinel	T	Astrophysique.
Balkansky		Physique (M.P.C.).
Le Corre	T	Électricité.
Delcroix	T	Physique théorique (Orsay).
Gourdin		Physique théorique des hautes énergies (Orsay).
Lehmann	T	Physique expérimentale des hautes énergies.
Nataf	T	Physique nucléaire et radioactivité (Orsay).
Echalier		Biologie animale (P.C.B.).
Barraud		Physiologie cellulaire.
Lioret		Physiologie végétale (Orsay).
Dars		Géologie structurale et Géologie appliquée.
Camefort	T	Botanique (agrégation).
Vichniewsky	T	Mécanique industrielle.
Blaquière		Électronique (Orsay).
Arnous	T	Physique théorique.
Cadiot		Chimie organique (E.N.S.C.P.).
Rigaudy		Chimie (S.P.C.N.).
Collongues		Chimie (C.P.E.M.).
Talbot		Génie chimique.
Tatibouet		Chimie (C.S.U. Orléans).
Malliavin	T	Mathématiques Propédeutique (Orsay).
Gaudemar		Chimie propédeutique.
Perez y Jorba		Physique expérimentale des hautes énergies (Orsay).
David	T	Chimie (agrégation Orsay).
Brousse	T	Mécanique théorique.
Rosch	T	Astronomie.
Guy	T	Physique expérimentale.
Lazard		Mathématiques (M.P.C.).
Morel		Physique (M.P.C.)
Maitte	T	Chimie (P.C.B.).
Meyer		Physique propédeutique.
Nicolas		Géologie appliquée.
Panigel		Biologie générale.
Ravier		Pétrographie.
Roseau	T	Mécanique théorique des fluides.
Roubine		Électronique.
Silber	T	Chimie (P.C.B.).
Uebersfeld	T	Électronique.
Yvon	T	Théories physiques.
Hervé	T	Mathématiques.
Jancovici		Physique atomique (Orsay).
Falk-Vairant		Physique nucléaire (Orsay).
Fetizon		Chimie propédeutique (Orsay).
Cerf		Mathématiques (Orsay).
Arsac		Programmation.
Lefebvre		Chimie (M.P.C.).
Chapeville		Biochimie.
Benoit		Physique (C.P.E.M.).
Rio		Chimie (C.P.E.M.).
Jauzein		Géologie (E.N.S.).
Prévost (G.)		Biologie végétale (C.P.E.M.).
Favard (P.)		Biologie animale (C.P.E.M.).
Vilkas		Chimie (C.P.E.M.).
Mlle Ficini		Chimie (C.P.E.M.).
Lequeux		Astronomie.
Cohen Tannoudji.		Physique (M.P.C.).
Taverniep		Physique (C.P.E.M.).
Mme Roizen		Physique (C.P.E.M.).
Durand (M.)		Biologie animale (S.P.C.N.).
Pascaud		Physiologie.
Mme Petit		Biologie animale (C.P.E.M.).
Brousse		Géologie (Orsay).
Gagniac		Physique agrégation (Orsay).
Leberre		Zoologie (Orsay).
Scheffer		Microbiologie (Orsay).
De Gennes		Physique des solides (Orsay).
Riou		Physique nucléaire expérimentale (Orsay).
Clauser		Chimie biologique (Orsay).
Chevalier		Physiologie animale (Orsay).

Le secrétaire général..... R. Poullain

SUR QUELQUES ASPECTS DE LA BIOLOGIE DES ORTHOPTÈRES EN RELATION AVEC LA PRÉSENCE DE CONCENTRATIONS MICROBIENNES (BACTÉRIES INTESTINALES, RICKETTSIES)

PAR

Roger MARTOJA

SOMMAIRE

INTRODUCTION 9
MATÉRIEL ET TECHNIQUES 11

PREMIÈRE PARTIE

LES CONCENTRATIONS BACTÉRIENNES
DE L'INTESTIN POSTÉRIEUR DES ORTHOPTÈRES

Signification anatomique et biologique du segment à villosités de l'intestin des *Grylloidea* 15

I. Le segment lisse et le segment à villosités, chez *Gryllus bimaculatus* 18
A. Quelques faits anatomiques 18
B. Quelques données histologiques 19
C. Le problème de la valvule proctodéale 26
D. Données embryologiques 28
E. Données histophysiologiques 28
F. Signification de l'uretère 30
G. Nature de l'humeur noire ou rembrunie 31

II. Caractères de l'iléon dans quelques groupes d'Orthoptères 33
A. Espèces dépourvues d'uretère 33
B. Espèces possédant un uretère 34

Les bactéries intestinales chez les *Gryllacridoidea*, les *Tettigonioidea* et les *Acridoidea* 37

La flore bactérienne des *Grylloidea* et son importance dans la physiologie de l'hôte 38

I. Les bactéries de l'iléon de *Gryllus* :
A. Localisation et nature des germes 39
B. Évolution de l'iléon et de sa flore au cours de la vie larvaire 43
C. La flore intestinale au cours du cycle digestif 46
D. La flore intestinale au cours du jeûne 48
E. La flore intestinale au cours de la diapause nymphale 49
F. La flore intestinale au cours de la mue 49

II. Défaunation partielle ou totale de l'hôte. Biologie des Grillons aseptiques ou pseudo-aseptiques 56
A. Action des antibiotiques sur la flore intestinale de *Gryllus bimaculatus*. 56
B. Suppression de la flore intestinale par l'élevage en milieu aseptique ... 61

III. L'infestation des nouveaux-nés 67
IV. Sur quelques points de la physiologie des Orthoptères, en rapport avec la présence de concentrations bactériennes intestinales 69
A. Introduction et problèmes techniques 69
B. Quelques aspects du métabolisme du soufre 72
1. Incorporation du soufre minéral 72
a) Espèces à segment bactérien (*Gryllidae, Gryllotalpidae*) 75
b) Espèces dépourvues de segment bactérien (*Acridoidea, Tettigonioidea*) 86
c) Espèces à segment bactérien partiellement ou totalement défauné. 98
d) Espèces dépourvues de segment bactérien et défaunées 99
e) Importance des bactéries dans le métabolisme du soufre minéral ... 103
α Résultats de l'incorporation du précurseur aux cultures bactériennes 103
β Données tirées de l'analyse de la flore intestinale, *in situ* 105
γ Données tirées de l'analyse de l'hémolymphe de Grillons injectés au radiosulfate 106
δ Les composés soufrés utilisés par les micro-organismes 107
2. Conversion de la cystéine en méthionine 111
a) Résultats 111
b) Importance des bactéries dans le processus de conversion 112
C. Utilisation de la cellulose 113
D. Utilisation de l'urée 114
1. Résultats 115
2. Importance des micro-organismes dans l'utilisation de l'urée 117
Discussion 119

Deuxième partie

RICKETTSIELLA GRYLLI VAGO & MARTOJA, RICKETTSIE PATHOGÈNE DES ORTHOPTÈRES.

Description de la maladie chez les Grillons 128
I. Caractères anatomiques des Grillons malades 130
II. Caractères morphologiques et histochimiques des germes 131
III. Évolution morphologique des foyers rickettsiens dans les cellules infectées. 132
IV. Caractères histopathologiques de la rickettsiose 133
V. Développement de la rickettsiose chez *Gryllus*. État moyen des insectes contaminés 153
Essais de contamination expérimentale dans divers groupes d'Orthoptères .. 154
I. Contamination expérimentale des *Grylloidea* 155
II. Contamination expérimentale des *Tettigonioidea* 155
III. Contamination expérimentale des *Acridoidea* 158
A. *Acrididae, Oedipodinae* 158
B. *Catantopidae* 162
C. *Pyrgomorphidae* 170
La contamination naturelle des Insectes 171
I. Données tirées de l'examen histologique des gonades 171
II. Données expérimentales 172
Sensibilité des germes aux antibiotiques. — Conséquences pratiques 173
Discussion 175
Résumé 182
Bibliographie 185

INTRODUCTION

Les relations susceptibles de s'établir entre insectes et micro-organismes ont depuis très longtemps attiré l'attention des Entomologistes En effet, les insectes peuvent héberger deux types de micro-organismes Ou bien ce sont des germes inoffensifs et il se constitue, alors, une association qui intéresse le physiologiste, ou bien ce sont des micro-organismes pathogènes, soit pour l'Insecte lui-même, soit pour un hôte ultérieur et, dans ce cas, les problèmes posés relèvent respectivement de la pathologie et de l'entomologie médicale.

L'hypothèse d'une symbiose eut pour origine, la découverte de nombreux germes extracellulaires dans le tube digestif de certains insectes de bactérioïdes et de levures intracellulaires dans certaines cellules d'autres insectes. L'importance de ce second type d'association, soupçonnée depuis longtemps, ne fut réellement prouvée qu'au cours des vingt dernières années, grâce à l'étude, au moyen de radio-isotopes, de certaines voies du métabolisme intermédiaire où sont engagés les micro-organismes. Le rôle des flores intestinales, par contre, fut pressenti depuis le début du siècle et étudié lors de recherches de Physiologie comparée et de Biochimie traditionnelle. Les Isoptères (Termites) et certains Coléoptères (Lamellicornes), constituèrent le matériel classique comme en témoignent les nombreuses mises au point et les traités de Physiologie consacrés à l'insecte. Il semble, si l'on en croit certains travaux récents sur les Thysanoures (Lasker & Giese, 1956) ou sur les Dictyoptères (Henry & Bloch, 1960-1961) que l'importance physiologique des bactéries intestinales ait été parfois surestimée, mais ceci n'exclut pas qu'elles puissent jouer un rôle marquant dans certains groupes tels les Coléoptères. Bien que les études de symbiose entre Insectes et micro-organismes aient été nombreuses, aucune recherche de cet ordre n'a été effectuée chez les Orthoptères *sensu stricto*. Pourtant, la variété des régimes, la diversité de structure du tube digestif et, dans certaines familles, l'existence à son niveau, de particularités anatomiques reconnues dès le début du XIX^{e} siècle, de brèves indications concernant des bactéries localisées dans le proctodeum et la présence fréquente d'une flore intestinale dans des ordres voisins, constituaient autant d'indices propres à susciter de tels travaux.

Négligés du point de vue de l'étude des germes symbiotiques, les Orthoptères le furent également du point de vue de l'étude des germes parasites et le récent traité de Pathologie des Insectes de Steinhaus (1963) en témoigne clairement. Aucun Orthoptère n'a été reconnu vecteur

de germes. Ni viroses, ni rickettsioses n'ont été signalées. Seules furent décrites des infections causées par des champignons, des amibes et des bactéries. Certains champignons restent localisés dans le tégument tandis que d'autres envoient des myceliums jusqu'aux organes internes. L'amibe *Melamoeba* se localise dans la lumière du tube digestif et dans les cellules des tubes de Malpighi. La multiplication de certaines bactéries dans l'hémolymphe entraîne des septicémies. Mais les désordres organiques dus à de tels agents pathogènes restent assez limités et se prêtent mal à des recherches approfondies d'*Histopathologie* qui présente, par conséquent d'énormes lacunes.

Ces raisons m'ont incité à entreprendre la recherche de micro-organismes susceptibles de former des concentrations importantes dans l'organisme des Orthoptères dont le plus grand nombre possible d'espèces a été pris en considération. Deux exemples de relations entre Orthoptères et concentrations microbiennes ont été choisis et abordés par les méthodes histologiques et certaines techniques biochimiques. Le premier représente un cas de symbiose, le second, qui met en cause le groupe assez mal connu des rickettsies pathogènes d'Insectes, permet d'étudier un état pathologique suivi de désordres graves au niveau d'un grand nombre d'organes (*).

(*) Le Professeur G. Cousin, directeur du Service de Biologie animale S.P.C.N., m'a permis de réaliser ce travail dans son laboratoire et a mis à ma disposition les moyens matériels nécessaires. Le Docteur M. Gabe, Directeur de recherches au C.N.R.S., n'a cessé de manifester un intérêt bienveillant à l'égard de mes résultats. Le professeur P.P. Grassé, membre de l'Institut, a bien voulu accepter la présidence de mon jury de thèse. Que chacun d'eux veuille bien trouver ici l'assurance de ma profonde reconnaissance.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Les recherches ont porté sur diverses espèces appartenant toutes à l'ordre des Orthoptères *sensu stricto :*

Ensifères	***Grylloidea***	Gryllidae — *Gryllinae* ..	*Gryllus bimaculatus* de Geer (Grillon à deux taches).
			Gryllus capitatus Sauss.
			— *posticus* Walk.
			— *campestris* L. (Grillon champêtre).
		— *Nemobiinae.*	*Nemobius sylvestris* Bosc. (Grillon des bois).
		Gryllotalpidae	*Gryllotalpa gryllotalpa* L. (Courtilière).
		Oecanthidae	*Oecanthus pellucens* Scop. (Grillon d'Italie).
		Mogoplistidae	*Mogoplistes squamiger* Fisch.
	Tettigonioidea		*Tettigonia viridissima* L. (Sauterelle verte).
			Orphania denticauda Charp.
			Barbitistes fischeri Yersin.
			Leptophyes punctatissima Bosc.
			Phaneroptera falcata Poda.
			Conocephalus fuscus F.
			Pholidoptera griseoaptera de Geer.
			Platycleis grisea E.
			Decticus verrucivorus L.
			Metrioptera roeseli Hagenb.
	Gryllacridoidea		*Tachycines asynomorus* Adelung. (Sauterelle des serres).
			Dolichopoda linderi Duf. (Sauterelle des grottes).
Caelifères	***Acridoidea***	Acrididae — *Oedipodinae.*	*Locusta migratoria* R. & F. (Criquet migrateur).
			Oedipoda coerulescens L.
		— *Acridinae* ..	*Acrida turrita* L.
		Catantopidae	*Schistocerca gregaria* Forsk. (Criquet pèlerin).
			Anacridium aegyptium L. (Criquet égyptien).
		Tetrigidae	*Tetrix tenuicornis* Sahlb.

Certaines espèces sont élevées au laboratoire (*Gryllus, Locusta, Schistocerca*). Les autres ont été récoltées dans la nature et maintenues en élevage pendant la durée des expériences. Les stades larvaires ont été reconnus par numération des stries oculaires pour *Schistocerca*, par la récolte de sexuvies pour *Locusta*, par marquage du tégument à l'encre blanche pour *Gryllus*.

Pour la *mise en évidence des micro-organismes*, certaines méthodes bactériologiques ont été utilisées :

1° La méthode de Gram et la coloration au bleu de méthylène, pour les frottis de bactéries.

2° La méthode de Machiavello, variante de Stamp, pour les frottis de rickettsies.

Pour les *études histologiques et histochimiques*, les méthodes suivantes ont été mises en œuvre :

1° Colorations topographiques ou cytologiques :

Azan de Heidenhain;
Trichrome de Prenant, variante Gabe;
Trichrome de R. y Cajal;
Trichrome de Millot;
Hémalun-picro-indigo carmin;
Méthode de Mann-Dominici;
Trichrome en un temps (Gabe et Martoja-Pierson, 1957).
Méthode d'Altmann-Gabe, pour le chondriome.

2° Réactions ou méthodes signalétiques des Glucides :

Réaction à l'acide périodique-Schiff (A.P.S.), avec contrôles par l'amylase pour le *glycogène*, par l'acétylation réversible pour les glucides oxydables en 1,2-glycol.
Coloration au bleu alcian et réaction métachromatique au bleu de toluidine à pH 4,2, pour les *mucopolysaccharides acides*.
Réaction métachromatique, après méthylation de 4 heures à 37° C, ou après méthylation suivie de saponification (KOH 0,1 N pendant 30 mn) pour la distinction des *groupements anioniques* des mucopolysaccharides acides; méthylation à 60 ° C pour la désulfatation des mucopolysaccharides (Spicer et Lillie, 1959; Spicer, 1960). Réaction métachromatique à pH 3 pour les *mucopolysaccharides sulfatés*.
Réaction métachromatique après traitement par la pepsine, pour les *polysaccharides « masqués »*.

3° Méthodes de mise en évidence des Glycoprotides :

Réaction à l'A.P.S., avec contrôle par l'acétylation réversible et par l'extraction enzymatique (pepsine ou trypsine, modes opératoires de Pearse, 1953).

4° Réactions des groupements protidiques :

Méthode de Yasuma et Ichikawa (1953) pour les *α-aminoacides*.
Tetrazoréaction de Danielli (Pearse, 1953) pour les *amino-acides phénoliques*.
Méthode de Morel-Sisley, variante de Lillie (1957) pour la *tyrosine*.
Méthode de Chèvremont & Frédéric et méthode au 2,2′ dihydroxy-6,6′ disulfure de dinaphtyle (D. D. D., Barrnett & Seligman, 1952), avec ou sans réduction, et avec contrôle par l'iodo-acétate de sodium, pour les *protides sulfhydrilés*.
Méthode de Glenner (1957) pour les *indols*.

5° Méthodes de détection de l'A.D.N. et de l'A.R.N. :

Mélange de Unna.
Gallocyanine.
Réaction nucléale de Feulgen-Rossenbeck.
Réaction nucléale de De Lamatter, combinée à l'A.P.S. (mode opératoire de Himes & Morrimer, 1956).
Les contrôles ont été effectués par la ribonucléase et par la désoxyribonucléase.

6° Méthodes de mise en évidence des déchets du métabolisme :

Pour l'*acide urique* et les *urates*, technique de Gomori (1952) à l'hexaméthylène tétramine d'argent, ou observation au microscope polarisant de coupes non colorées.

7° Méthodes de mise en évidence des Lipides :

Pour les *lipides soudanophiles*, coloration au rouge Soudan III ou au noir Soudan B (Lison, 1934, variante de 1960).

Pour les *glycérides*, coloration au bleu de Nil (variante à froid du mode opératoire de Cain, 1947).

Pour les *phospholipides*, réaction de Smith-Dietrich (1909-1910) et réaction de Baker (1946).

8° Distinction des pigments :

Pour les *pigments phénoliques* (mélanines), examen de la coloration naturelle; recherche de l'insolubilité dans les acides et les bases diluées, du blanchiment par le permanganate de potassium, des propriétés réductrices à l'égard de l'hexaméthylène-tétramine d'argent ou du ferricyanure ferrique.

Pour les *pigments lipogènes* (chromolipoïdes), coloration par le noir Soudan B, recherche de la résistance au blanchiment, de la basophilie acquise par oxydation (coloration à la fuchsine-paraldéhyde après oxydation permanganique).

9° Méthodes de l'enzymologie :

Pour les *phosphomonoestérases alcalines*, méthode de Gomori & Takamatsu au glycerophosphate; méthode de Menten, Junge & Green (1944, variante de Gomori, 1951) au naphtylphosphate .

Pour les *phosphomoestérases acides*, méthode de Gomori (1950) au glycérophosphate; méthode de Grogg et Pearse (1954) au naphtylphosphate.

Pour les *aliestérases* et les *lipases*, méthode aux tweens (40, 60 ou 80) de Gomori; méthode de Nachlas & Seligman (1949), variante de Gomori (1952), à l'acétate d'α-naphtol.

Les modes opératoires des techniques histoenzymologiques ont tous été relevés dans les traités de Pearse (1953) et de Lison (1960).

Les *histo-autoradiographies* ont été réalisées par trempage des lames dans de l'émulsion nucléaire « in gel form » G 5 (Ilford), additionnée de son égal volume d'eau. Les coupes ont été colorées avant ou après couchage de l'émulsion. Dans le cas de recherches de radio-activité dans les lipides, ceux-ci ont été colorés par le rouge Soudan III, après développement de l'histo-autoradiographie. Les détails techniques concernant ces méthodes seront développés dans les chapitres correspondants. Il en sera de même pour l'exposé des techniques *biochimiques*.

PREMIÈRE PARTIE

LES CONCENTRATIONS MICROBIENNES DE L'INTESTIN POSTÉRIEUR DES ORTHOPTÈRES

Des micro-organismes existent dans le tube digestif de tous les Insectes. Quel que soit le niveau considéré, il est toujours possible d'isoler des germes d'espèces très diverses (cf. la flore du mésentéron de *Tenebrio molitor*, Wistreich, Moore & Chao, 1960, ou celle du mésentéron d'*Oncolpeltus fasciatus*, Feir, 1963). Mais l'existence de fortes concentrations de micro-organismes extra-cellulaires est plus rare et elle s'accompagne de modifications de la partie du tube digestif qui les héberge : dilatations (Termites), différenciations spéciales de la paroi (Coléoptères). C'est pourquoi la recherche des concentrations microbiennes ne peut être entreprise par les seules méthodes de la bactériologie. Il est nécessaire, avant d'envisager un isolement des germes, de considérer avec précision les caractères anatomiques et histologiques du tube digestif. La structure de celui des *Grylloidea* est si particulière et a donné lieu à des interprétations si opposées, que j'envisagerai en premier lieu de reconsidérer les bases sur lesquelles sont appuyées ces interprétations.

SIGNIFICATION ANATOMIQUE ET BIOLOGIQUE DU SEGMENT A VILLOSITÉS DE L'INTESTIN DES GRYLLOIDEA

Les premières descriptions anatomiques de l'appareil digestif des Orthoptères (Malpighi, Swammerdam, 1682; De Serres, 1813) représentent déjà un essai d'interprétation fonctionnelle; mais il résulte, malheureusement, d'une comparaison hâtive avec l'appareil digestif des Vertébrés. Quelques-uns des termes créés alors sont encore en usage (œsophage, gésier), mais certains ne s'appliquent plus aux segments qu'ils désignaient au début du siècle dernier. A Dufour (1841) est due une division plus correcte du conduit alimentaire. Son interprétation de la partie antérieure reste valable, sauf en ce qui concerne le gésier des *Acridoidea :* elle intègre les caeca (« bourses » ou « poches ventriculaires ») au « ventricule chylifique » nommé aujourd'hui mésentéron. La partie terminale, est divisée en deux régions, le « côlon » et le « rectum ». En outre, Dufour insiste sur certaines particularités du tube digestif des « Grilloniens » (*Gryllotalpa*, *Gryllus*, *Oecanthus*) déjà notées par de Serres. Ainsi, on sait, dès cette époque, que le ventricule chylifique, dont la limite postérieure correspond au point d'abouchement du « canal hépatique » (en réalité, l'uretère), comprend toujours deux parties, une antérieure

lisse, une postérieure boursouflée, pourvue de « papilles » internes, et pleine d'une « mucosité abondante qui lubrifie intérieurement cet intestin » (DE SERRES) ou d'une « humeur noire ou rembrunie » (DUFOUR). Cependant, la structure du ventricule chylifique paraît alors si énigmatique que DUFOUR ne se risque pas à en donner une interprétation physiologique.

Plus tard, les recherches d'embryologie introduisent la division désormais classique du tube digestif en trois segments : intestin antérieur ou stomodeum; intestin moyen ou mésentéron; intestin postérieur ou proctodeum. A la fin du siècle dernier, les techniques microscopiques, appliquées au tube digestif des Insectes, permettent de dégager les caractères des cellules épithéliales de ces divers segments. C'est par ces méthodes que, dès 1886, FRENZEL constate que l'uretère de *Gryllotalpa* ne s'abouche pas, comme c'est la règle générale pour l'appareil excréteur des Insectes, à la limite du mésentéron et du proctodeum, mais au milieu du proctodeum lui-même.

CUÉNOT (1895) étend à l'ensemble des « Grillons » (*Nemobius*, *Gryllus*, *Gryllotalpa*) les données de FRENZEL, qui sont plus tard confirmées par SAYCE (1898, *Gryllotalpa*) et par BERLESE (1909, *Gryllus*). Cette interprétation implique que la partie postérieure du ventricule chylifique appartienne au proctodeum. BERLESE considère les papilles qui la tapissent intérieurement comme étant responsables de l'absorption; à la même époque, HENNEGUY (1904) suggère une fonction respiratoire.

Le mémoire fondamental relatif au tube digestif des Orthoptéroïdes (BORDAS, 1898) remet en question les données précédemment acquises. Le schéma anatomique proposé par BORDAS pour les *Acridoidea*, les *Tettigonioidea* et les *Gryllacridoidea* est encore très valable, malgré quelques lacunes concernant l'intestin postérieur. L'auteur établit que la structure de l'intestin moyen (ventricule chylifique de DUFOUR) est toujours uniforme, sauf chez les « *Gryllidae* » (*Nemobius*, *Brachytrypes*, *Gryllus*, *Gryllotalpa*) où ce segment comprend bien deux régions : une antérieure lisse, une postérieure pourvue de papilles internes, ou villosités, qui « affectent quelque ressemblance avec les villosités de l'intestin des Mammifères, et doivent jouer un grand rôle dans l'accomplissement des fonctions digestives ». L'interprétation de BORDAS concernant l'anatomie des *Grylloidea* (fig. 1), est donc un retour à la conception de DUFOUR. Bien qu'elle n'ait été étayée par aucun argument histologique, c'est cette interprétation qui fut adoptée par la suite, au moins pour les *Gryllinae* et *Nemobiinae* (fig. 1) : ANDER (1939) s'y réfère dans sa monographie d'anatomie et de morphologie comparées des Ensifères; CHOPARD (1949, fait de même dans le traité de Zoologie de Grassé. En ce qui concerne les *Gryllotalpidae*, c'est tantôt l'interprétation de BORDAS qui est adoptée (CARPENTIER, 1937), plus souvent celle de FRENZEL (STAMMER, 1950; JARRY, 1964).

Des travaux récents sur l'histologie du tube digestif des *Acridoidea* (HODGE, 1939; MIQUEL, 1962; MAHMOUD HAFEZ IBRAHIM, 1959; MAHMOUD HAFEZ KHAN, 1964) apportent des précisions supplémentaires à un schéma anatomique suffisamment bien établi pour qu'on ait pu

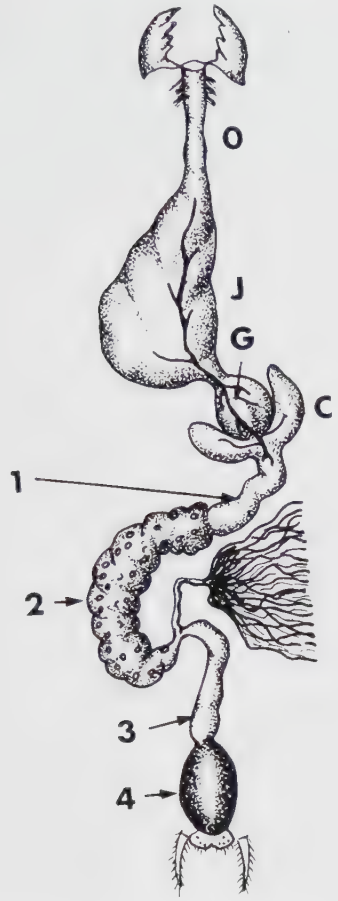


Fig. 1, Tube digestif de *Nemobius sylvestris* (d'après Bordas).

	INTERPRÉTATION DE BORDAS	INTERPRÉTATION PERSONNELLE
O	Œsophage	Œsophage
J	Jabot	Jabot
G	Gésier	Gésier
C	Caeca	Caeca
1	Intestin moyen antérieur (segment lisse)	Intestin moyen
2	Intestin moyen postérieur (segment à villosités	Iléon (segment à villosités)
3	Ensemble du proctodeum	Côlon
4		Rectum

envisager d'y étudier les mécanismes de l'absorption (Treherne, 1958-1959, 1962; Goodhue, 1963). Par contre, chez les *Grylloidea*, où les dernières descriptions histologiques relatives à tous les segments remontent au début du siècle, il était nécessaire de reconsidérer le problème de

la signification anatomique et biologique de l' « intestin moyen » (au sens de Bordas), et plus particulièrement du segment à villosités. La grande ressemblance de ces dernières avec des replis de la paroi de l'iléon des Coléoptères, ressemblance déjà signalée par Dufour, ainsi que l'existence d'une « humeur noire » au même niveau, incitaient également à reprendre l'étude des *Grylloidea* dans le cadre d'un travail consacré aux relations existant entre les Orthoptères et certains micro-organismes puisque l'iléon des Coléoptères en question héberge une flore intestinale de couleur brunâtre (Couturier, 1961).

I. — Le segment lisse et le segment à villosités chez Gryllus bimaculatus

Avant toute autre considération, il était nécessaire de trancher entre la conception de Frenzel d'une part, et celle de Bordas d'autre part. Dans ce but, les caractères anatomiques, histologiques, embryologiques, physiologiques du segment lisse et du segment à villosités ont été comparés chez les imagos. Des frottis d'« humeur noire » ont été examinés. J'adopterai la terminologie suivante, qui s'applique sans difficulté au tube digestif des Caelifères et à celui des *Tettigonioidea* et *Gryllacridoidea :*

Stomodeum (intestin antérieur)..	œsophage
	jabot
	gésier
Mésentéron (intestin moyen)....	caeca
	ventricule (partie rectiligne)
Proctodeum (intestin postérieur).	iléon
	côlon
	rectum

A. Quelques faits anatomiques.

L'argument majeur qui justifie l'intégration du segment à villosités au mésentéron, repose sur le principe des connexions, plus précisément sur les rapports anatomiques entre systèmes digestif et excréteur : dans tous les cas connus, le point de jonction entre les tubes de Malpighi et le tube digestif marque la limite postérieure du mésentéron. Or, il est facile de vérifier, par l'examen anatomique ou histologique, que le canal collecteur des tubes de Malpighi (uretère) (*) s'abouche, chez tous les *Grylloidea*, à la limite postérieure du segment à villosités. La signification de cet uretère sera discutée plus loin.

D'autres arguments peuvent également être pris en considération : ainsi que j'ai pu le constater chez de nombreux *Acridoidea*, le proctodeum comprend toujours trois régions (iléon, côlon et rectum), que l'on peut retrouver, mais avec un peu moins de netteté, chez les *Gryllacridoidea*

(*) J'adopterai le terme « uretère », de préférence à celui d'« urètre », plus communément employé.

et les *Tettigonioidea*. La partie du canal digestif, qui est postérieure au point d'abouchement de l'uretère, n'est formée, chez *Gryllus*, que de deux segments, soit un de moins que chez les autres Orthoptères. C'est par les méthodes de l'histologie qu'il fallait rechercher la nature de ces deux segments afin de discuter de leurs homologies.

B. Quelques données histologiques.

La paroi du *segment lisse* (pl. 1, fig. 1 à 4) de l'intestin moyen comprend une musculeuse et un tissu conjonctif minces, recouverts par un épithélium. Les groupes de cellules de régénération sont nombreux à la base de l'épithélium, tant au niveau des caeca que du ventricule. L'épaisseur de la couche épithéliale n'est que de 50 à 70 μ dans les caeca, mais elle atteint 130 à 150 μ dans le ventricule. Les cellules épithéliales autres que les cellules de régénération, sont hautes et pourvues d'un rhabdorium. Leur noyau est ovoïde (18 $\times$ 10 μ), orienté parallèlement au grand axe de la cellule; les grains de chromatine sont très petits, peu nombreux, et il existe des cristalloïdes intranucléaires. Le cytoplasme, filamenteux, est basophile et très riche en ribonucléines, en protides sulfhydrilés et en amino-acides phénoliques. Le chondriome comprend une bande apicale de mitochondries et un mélange de mitochondries et de chondriocontes dans le reste de la cellule. Les estérases non spécifiques existent dans tout le cytoplasme; les phosphomonoestérases alcalines présentent un maximum d'activité à l'apex cellulaire. A l'exception des éléments de régénération, toutes les cellules possèdent en commun cet ensemble de caractères. Mais l'estimation quantitative de certains constituants chimiques du cytoplasme, de même que l'observation de quelques particularités morphologiques, permettent de distinguer deux aspects cellulaires. Il existe, en effet, des cellules dont la teneur en A.R.N. et en amino-acides est de beaucoup supérieure à celle des autres éléments épithéliaux (pl. 1, fig. 2, 3 et 4). Ces cellules sont très nombreuses dans les caeca, où elles sont isolées parmi les autres; elles existent aussi dans le ventricule, où elles constituent de petits groupes. Leur noyau est souvent en position très apicale et, à certains stades du cycle digestif, quand le bol alimentaire atteint la lumière du mésentéron, il y a extrusion du noyau et du cytoplasme périnucléaire, ce qui rappelle certaines sécrétions décrites par Léger & Duboscq (1900). Il est difficile de préciser si ces deux aspects cellulaires traduisent des états fonctionnels différents, ou s'il existe deux lignées cellulaires distinctes; mais il sera nécessaire de prendre ces différences en considération à propos des recherches sur la fixation des sulfates.

La paroi du *segment à villosités* est plus mince (30 à 40 μ) (pl. 2, fig. 2), contrairement à ce que laisse prévoir l'examen anatomique (Dufour, 1841). Son aspect conduit à reconsidérer la notion de « villosité » ou « papille » introduite par les anciens auteurs. En effet, il existe des plis où l'épithélium ne subit aucune modification et dans lesquels s'engage la musculeuse (fig. 6); il s'agit là de véritables villosités, mais elles ne

TABLEAU 1. — COMPARAISON DE QUELQUES CARACTÈRES CYTOLOGIQUES ET HISTOCHIMIQUES DU SEGMENT LISSE ET DU SEGMENT A VILLOSITÉS DE *Gryllus bimaculatus*.

	SEGMENT LISSE		SEGMENT A VILLOSITÉS	
	CAECA	VENTRICULE	CELLULES DES PAPILLES	CELLULES DES RÉGIONS PLATES
Epaisseur totale de la paroi	40 à 50 µ	130 à 150 µ	20 µ	30 à 40 µ
Cellules de régénération	+	+	—	—
Cellules épith. fonctionnelles :				
dimensions nucléaires	18 × 10 µ	15 à 18 × 10 µ	6 µ	10 à 12 µ
différenciation apicale	rhabdorium	rhadborium	intima	chitineuse
A.R.N.	+++	+++	±	±
glycogène	—	—	+	parfois
groupements — SH	+ ou +++	+ ou +++	—	—
α-amino-acides	+ ou ++	+ ou ++	—	—
amino-acides phénoliques	+ ou +++	+ ou +++	—	—
phosphatase alcaline	+++	+++	—	—
estérases non spécifiques	+++	+++	—	—

Légendes de la planche

PLANCHE 1

Histologie du tube digestif de *Gryllus* (*G. bimaculatus*, sauf fig. 6 et 7 *G. posticus*).

FIG. 1, Paroi du segment lisse, région du ventricule (Trichrome de R. y Cajal, 250 diamètres). Remarquer, à la base des cellules épithéliales, très hautes, les 2 nids de cellules de régénération; à l'apex des cellules, le rhabdorium (flèche).

FIG. 2, Paroi du segment lisse, région du ventricule : un groupe de cellules chromophiles (Azan, 400 diamètres).

FIG. 3, Paroi du segment lisse, région des caeca : quelques cellules chromophiles (Azan, 400 diamètres).

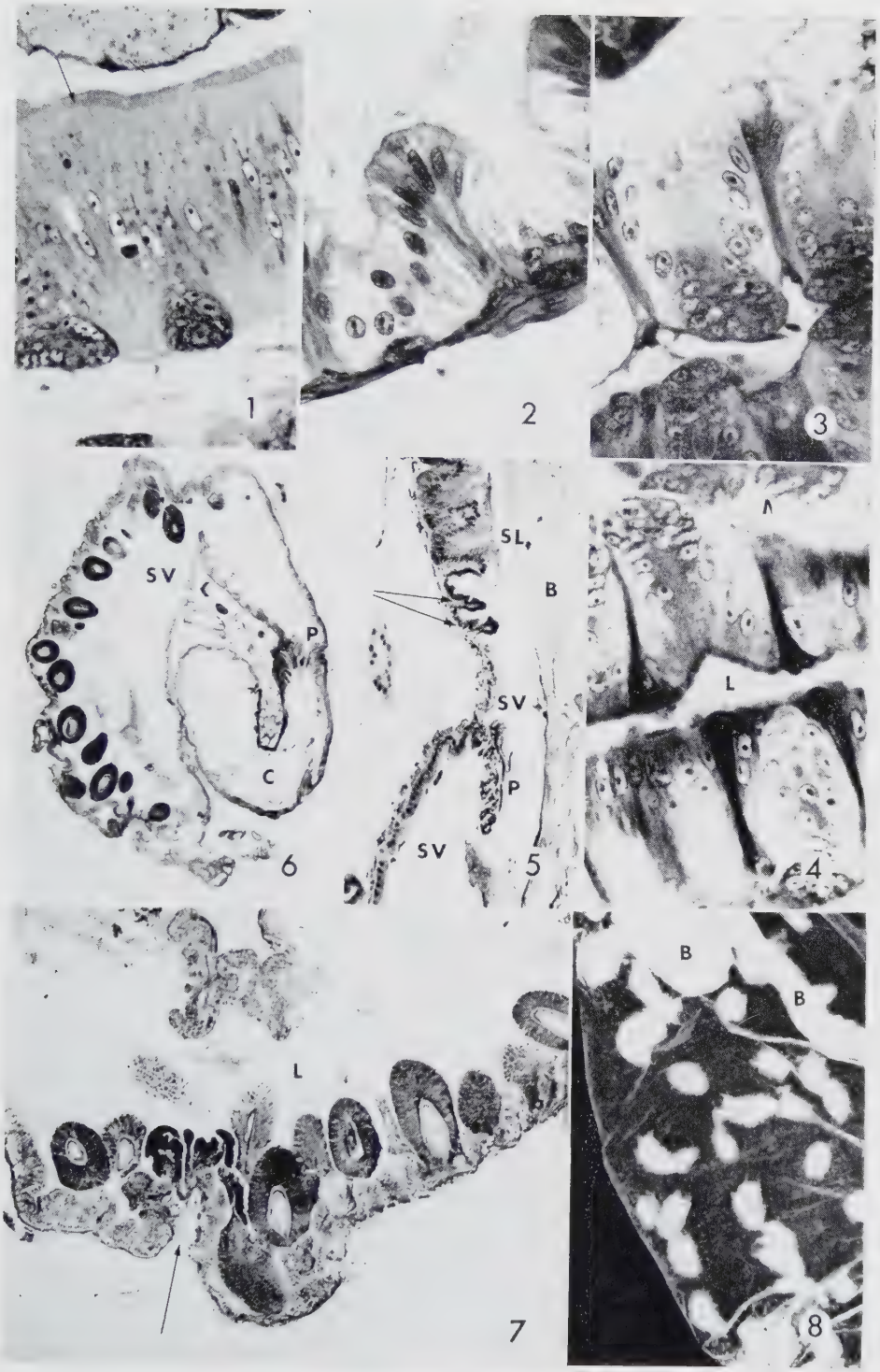
FIG. 4, Paroi du segment lisse, région des caeca : amino-acides phénoliques dans les cellules chromophiles (en noir) (Tetrazo-réaction de Danielli, 400 diamètres).

FIG. 5, Coupe longitudinale à la limite du segment lisse (S L) et du segment à villosités (SV) (Trichrome de R. y Cajal, 100 diamètres). Dans la lumière, le bol alimentaire (B); les deux flèches indiquent la valvule proctodéale. Dans la région antérieure du segment à villosités, un pli volumineux (P) qui peut obturer partiellement la lumière.

FIG. 6, Coupe longitudinale du segment à villosités (SV) et d'une partie du côlon (C), après ponction de la suspension bactérienne (Trichrome de R. y Cajal, 15 diamètres). A la limite des 2 segments, de volumineux plis (P) simulant une valvule. Sur la partie gauche de l'épithélium du segment à villosités, remarquer les nombreuses papilles.

FIG. 7, Détail de la coupe précédente. La lumière (L) est vidée de ses bactéries et de ses débris alimentaires; la flèche indique l'endroit où la paroi est perforée pour la ponction. Remarquer la grande densité des papilles.

FIG. 8, Fragment d'un segment à villosités traité par la potasse, observé en fond noir. Il subsiste : le bol alimentaire (B) enveloppé dans la membrane péritrophique, et l'intima chitineuse portant de nombreuses papilles. Celles-ci apparaissent globuleuses, car leurs aiguilles enchevêtrées retiennent les débris bactériens.


1
2
3
SV
P
C
6
SL
B
SV
P
SV
5
L
4
L
7
B
B
8

correspondent pas aux structures décrites par Dufour, Bordas ou Berlese. Celles-ci, localisées sur le côté convexe du segment (pl. 1, fig. 6), ne méritent pas ce terme, car elles représentent de simples plis épithéliaux dont l'axe ne contient que quelques fibres conjonctives, de petites trachées et surtout de l'hémolymphe à l'exclusion de fibres musculaires (pl. 2, fig. 2, 3 et 5). C'est pourquoi il paraît préférable de réserver, pour ces formations, le terme de « papille » déjà utilisé autrefois, mais comme synonyme de villosités. La présence de ces deux types de structures dans le même segment, justifie toutefois que soit conservé le terme de « segment à villosités », par opposition à celui de segment lisse.

L'épithélium est dépourvu de cellules de régénération. La hauteur des cellules varie en fonction de leur localisation. Celles qui constituent les papilles sont de petite taille et n'ont que 8 μ de haut; celles qui sont intercalées entre les papilles atteignent 25 μ (pl. 2, fig. 7). A l'extrémité postérieure du segment, les papilles disparaissent, la hauteur de l'épithélium diminue jusqu'à ne pas dépasser 15 μ au point d'abouchement de l'uretère, mais la diminution de l'épaisseur épithéliale est compensée par un renforcement de la musculeuse (pl. 2, fig. 4). Une disposition identique existe à la base de chaque papille. Il semble donc que le déve-

Légendes de la planche

PLANCHE II

Histologie du tube digestif de *Gryllus bimaculatus* (segment à villosités, côlon, rectum).

Fig. 1, Paroi du segment à villosités, dans la région moyenne du segment, entre les papilles (Trichrome en un temps, 400 diamètres). Dans la lumière du segment, bactéries (B).

Fig. 2 et 3, Coupes de papilles (parasagittale en 2, oblique en 3), après élimination, par ponction, des bactéries libres de la lumière (Trichrome de R. y Cajal, 50 diamètres). Au centre des papilles, hémolymphe abondante. La périphérie de chaque papille, très fuchsinophile, est riche en bactéries, retenues entre les aiguilles chitineuses invisibles ici.

Fig. 4, Coupe de la paroi du segment à villosités (Azan, 100 diamètres). Remarquer l'épaississement de la musculeuse (flèche) au niveau des papilles.

Fig. 5, Région axiale d'une papille (Azan, 350 diamètres). Remarquer, au centre, en noir, l'hémolymphe; en bas (flèche) la pénétration d'une trachée. La cuticule des cellules épithéliales est hérissée de dents et donne naissance aux aiguilles (flèche supérieure).

Fig. 6, Détail de la couronne bactérienne associée à une papille (Azan, 320 diamètres). A droite, épithélium de la papille; au centre, quelques-unes des nombreuses aiguilles chitineuses, parmi les germes (en gris).

Fig. 7, Modifications morphologiques de l'épithélium du segment à villosités à la base d'une papille (Azan, 320 diamètres). Remarquer l'aplatissement des cellules (flèche).

Fig. 8, Epithélium du côlon (Trichrome de Prenant, 400 diamètres). Comparer avec la fig. 1, et remarquer la similitude morphologique entre les deux épithéliums. Mais la lumière du côlon ne contient pas de bactéries. En B, bol alimentaire.

Fig. 9, Coupe parasagittale d'un fragment du rectum, chez une larve de 6e stade (Trichrome de Prenant, 50 diamètres). Remarquer les hautes cellules des glandes rectales (GR).

Fig. 10, Détail de la préparation précédente, au niveau d'une glande rectale (330 diamètres).

B
1
2
3
4
5
6
7
GR
B
8
9
10

loppement de la musculeuse compense tout amincissement de l'épithélium.

Dans l'ensemble, les cellules épithéliales sont cubiques. Une intima chitineuse assez mince les recouvre et porte des ornementations variées : dents courtes sur l'épithélium situé entre les papilles, longues tiges terminées chacune par une dizaine d'aiguilles, au niveau des papilles (pl. 2, fig. 6), l'ensemble de ces tiges composées formant une sorte d'« organe arborescent » selon le terme proposé par Mingazzini (1889) à propos des Coléoptères. Si la mise en évidence d'une telle intima présente des difficultés lors de l'examen histologique, et ceci pour des raisons qui seront exposées plus loin, son existence peut être facilement révélée après traitement du segment à villosités par la potasse alcoolique : l'intima persiste, ainsi que la membrane péritrophique; entre ces deux formations, les papilles apparaissent sous forme de boules ovoïdes assez compactes, car les nombreuses tiges chitineuses enchevêtrées (organe arborescent) maintiennent emprisonnées de nombreuses particules que la potasse élimine mal (pl. 1, fig. 8). L'existence de l'intima chitineuse suffirait, à elle-seule, à prouver l'origine proctodéale de ce segment. Les autres caractères cytologiques des cellules de ce segment sont très différents de ceux des cellules du segment lisse. Le noyau est sphérique et central; son diamètre n'est que de 6 μ dans les cellules des papilles, de 12 μ ailleurs. La richesse en chromatine est assez élevée; il n'existe pas de cristalloïde; le nucléole est de petite taille. Le cytoplasme présente, à la partie apicale des cellules non engagées dans les papilles, une striation perpendiculaire à la surface cellulaire. Les structures cytoplasmiques ne sont pas basophiles; on ne peut y déceler ni ribonucléines, ni amino-acides. La teneur en glycogène est très variable et liée au cycle d'intermue; elle est toujours plus importante au niveau de l'épithélium des papilles. Les méthodes de détection des estérases et des phosphomono-estérases alcalines donnent des résultats négatifs.

A l'examen au microscope électronique, les cellules cubiques présentent, à leur partie basale, des invaginations de la cytomembrane. Sous l'intima chitineuse, il existe un système compliqué d'invaginations de la cytomembrane, réalisant des microvillosités. Les régions moyenne et apicale de la cellule sont riches en mitochondries.

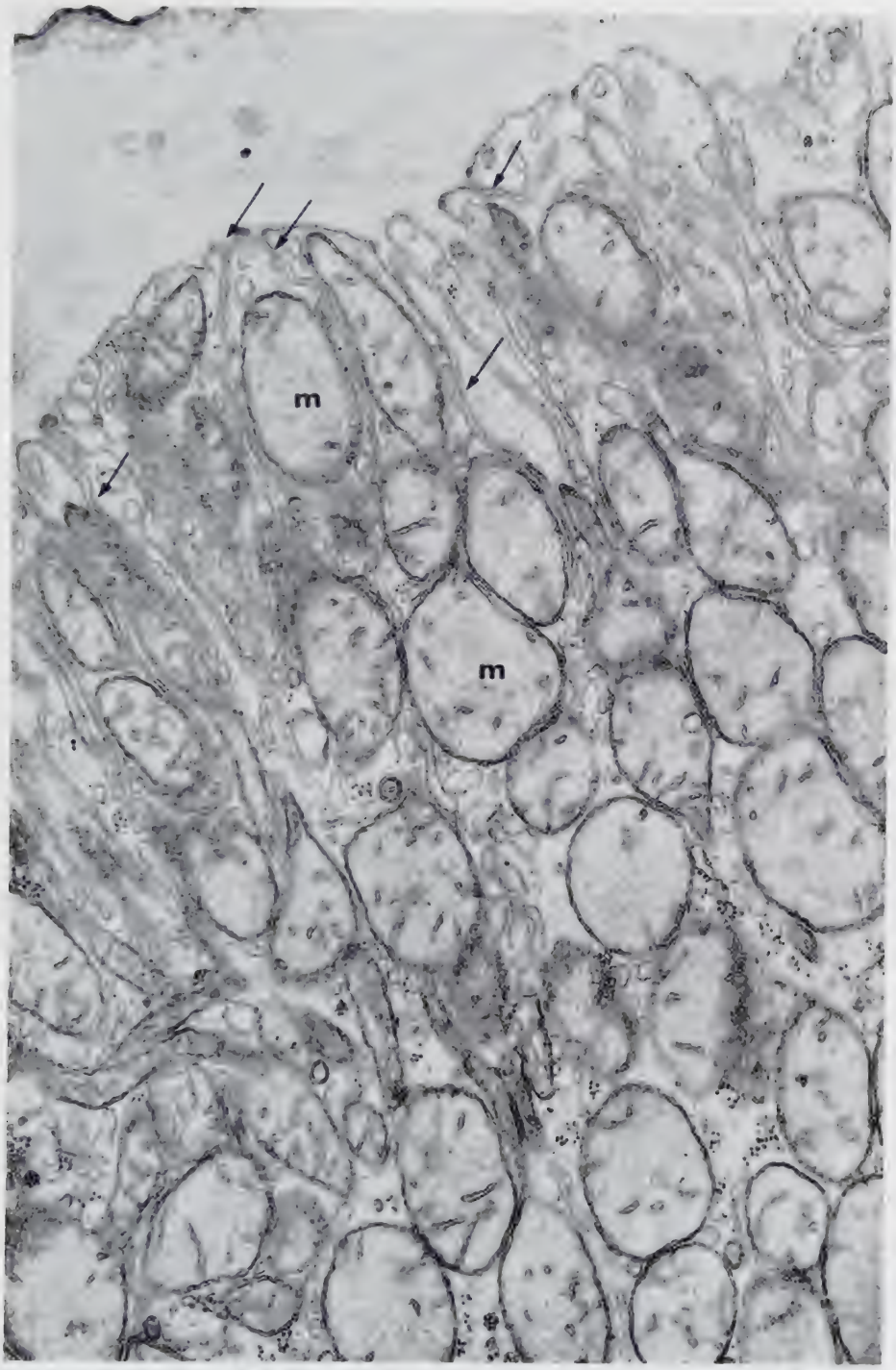
C'est donc par de nombreux caractères, qui sont résumés dans le tableau 1, que diffèrent le segment lisse et le segment à villosités.

Légende de la planche

PLANCHE III

Détail de la partie apicale d'une cellule du segment à villosités de *Gryllus bimaculatus*, prélevée dans une région plate (cellule non engagée dans la constitution des papilles). (Fixation au tetroxyde d'osmium, coloration à l'acétate d'urane, 35 000 diamètres).

Remarquer les nombreuses invaginations de la cytomembrane (microvillosités) (flèches), délimitant des compartiments cytoplasmiques riches en mitochondries (m). Préparation J. Taxi.


m
m

Quant à la signification anatomique des deux segments *postérieurs à l'uretère*, elle peut être déduite des données de l'histologie. La partie postérieure de cette région intestinale doit être homologuée à l'ampoule rectale des *Acridoidea* ou des autres Ensifères; dans tous ces groupes, il existe des glandes rectales dont les cellules principales (cellules du type I, Bacetti, 1962) ont des caractères identiques; ces glandes sont séparées par des bandes de cellules très plates. Il en va de même chez le Grillon (Pl. 2, fig. 9 et 10). Par contre, le segment qui est situé entre le rectum et l'uretère, possède plus de points communs avec le segment à papilles qu'avec le côlon des *Acridoidea*. Ceci tient au fait que les Caelifères possèdent un iléon et un côlon très différents l'un de l'autre, alors que les Ensifères ont un iléon et un côlon très semblables (tableau 2), quoique toujours bien individualisés par les valvules ou constrictions qui les limitent. Si la comparaison est limitée au groupe des Ensifères, le segment

Tableau 2. — Quelques caractères histologiques et cytologiques du colon et du rectum, chez les *Acridoidea*, *Gryllacridoidea* et *Tettigonioidea*, comparés a ceux des segments situés de part et d'autre du point d'abouchement de l'uretère, chez *Gryllus*.

	Plis internes	Hauteur épithél. (μ)	Forme noyaux	Dimension noyaux (μ)	Striation apicale	Glycogène	Hauteur épithél. (μ)	Forme noyaux	Dimension noyaux (μ)	Glycogène
	colon						rectum (*)			
Locusta migratoria	+++	25	sphérique	7	invis.	parfois	130	ovoïde	25×10	+
Acrida turrita	+++	15	sphérique	6	invis.	—	130	ovoïde	25×10	+
Anacridium aegyptium	+++	20	sphérique	8	invis.	—	100	ovoïde	25×10	+
Tachycines asynomorus	±	50	ovoïde	15×6	nette	—	110	peu allongé	15×12	+
Tettigonia viridissima	±	50	ovoïde	15×6	nette	—	75	peu allongé	20×15	+
	1° segment postérieur a l'uretère						2° segment postérieur a l'uretère			
Gryllus bimaculatus.....	++	50	ovoïde	10×6	nette	—	100	peu allongé	15×2	+

(*) Seuls les caractères des cellules principales des glandes rectales sont pris en considération.

intercalé chez le Grillon entre l'uretère et le rectum (Pl. 2, fig. 8), est tout à fait comparable au côlon des autres espèces. Donc la partie du proctodeum qui, chez *Gryllus*, est postérieure au point d'abouchement de l'appareil excréteur, comprend seulement le côlon et le rectum. Elle est dépourvue d'iléon et c'est une particularité anatomique dont il convient de rechercher la signification.

C. Le problème de la valvule proctodéale.

La mise en évidence d'une valvule proctodéale est l'un des critères qui permettent de situer sans ambiguité la limite postérieure de l'intestin moyen. Or, une constriction externe a effectivement été observée, par

Dufour, puis par Ander, entre les deux moitiés du « mésentéron » (au sens de Bordas), mais il convient de s'assurer qu'elle correspond bien à une valvule. Dans le cas contraire, il faudrait chercher si la valvule proctodéale n'est pas reportée au point d'abouchement de l'uretère (Bordas). L'examen histologique confirme l'existence, chez l'imago, d'un étroit anneau épithélial de 150 μ de large, qui sépare le segment lisse du segment à villosités (Pl. 1, fig. 5). La hauteur de ses cellules est intermédiaire entre celle des deux segments voisins. Elles sont recouvertes d'une intima chitineuse assez épaisse, et leurs caractères cytologiques et histochimiques les rapprochent davantage des cellules proctodéales que des cellules de l'intestin moyen. Mais, le caractère très particulier et constant de ces cellules est leur richesse exceptionnelle en glycogène. Or, comme j'ai pu le vérifier, le glycogène existe de façon constante et indépendante du cycle d'intermue, dans la valvule proctodéale des *Acridoidea* et des *Gryllacridoidea*. Chez l'imago, les cellules à glycogène de la valvule sont hautes et groupées en couronne. De plus, il existe, en avant de cette couronne, une mince bande de cellules plates, dont certaines, dépourvues de glycogène, sont accolées à l'épithélium du segment lisse; je les considère comme les cellules les plus antérieures de la valvule (fig. 2; pl. I, fig. 5).

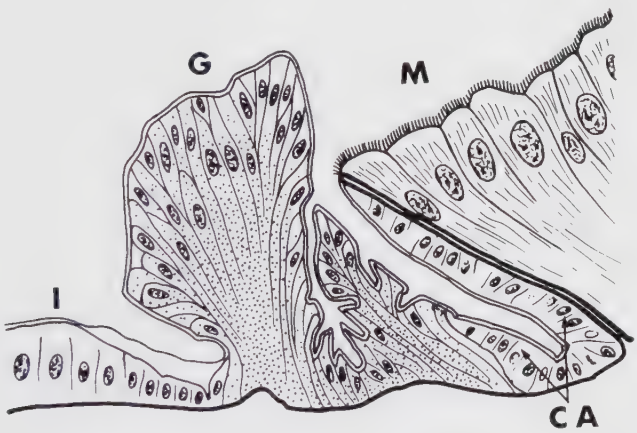


Fig. 2, Coupe longitudinale de la valvule proctodéale de *Gryllus bimaculatus* :
M : cellules du segment lisse (mésentéron); CA : cellules antérieures de la valvule; G cellules à glycogène de la valvule; I : segment à villosités (iléon), cellules cubiques.

L'examen des larves montrera que cette structure double existe toujours dans la valvule. La valvule, par sa taille réduite, est invisible à l'examen anatomique et il est probable qu'elle ne joue aucun rôle dans l'obturation du tube digestif. Du point de vue fonctionnel le rôle de valvule serait assuré par la couronne de plis qui la prolonge vers l'arrière. Mais l'histochimie comparée démontre que la valvule proctodéale, au sens de l'anatomie, est représentée par l'anneau qui sépare le segment lisse du segment à villosités. Au contraire, le point d'abouchement de l'uretère dans le

proctodeum, ne comporte aucune couronne cellulaire riche en glycogène. A ce niveau, la lumière est réduite par des plis épithéliaux profonds, qui ne sont que des villosités de la partie la plus antérieure du côlon; ils constituent une répétition, à un niveau plus postérieur, des plis qui peuvent obturer l'entrée du segment à villosités (pl. I, fig. 5).

En *conclusion*, c'est la constriction observée par les anciens auteurs entre le segment lisse et le segment à villosités qui correspond à la valvule proctodéale.

D. Données embryologiques.

L'épithélium du mésentéron, comme celui du stomodeum et du proctodeum, est d'origine ectodermique (voir les divers travaux consacrés à cette question, dans Roonwal, 1936). Mais, seule son ébauche enveloppe la masse du vitellus chez l'embryon. L'examen d'embryons de *Gryllus*, fixés à l'éclosion, doit permettre d'identifier avec certitude le mésentéron, puisqu'à ce stade, le vitellus le remplit encore (Heymons, 1895). De plus, à ce moment tardif du développement embryonnaire, on peut espérer que le tube digestif soit suffisamment achevé pour que les caractères cytologiques des divers segments soient assez comparables à ceux de l'imago.

L'examen de coupes sériées de nouveau-nés permet d'observer les faits suivants :

— la partie du tube digestif située postérieurement au point d'abouchement de l'uretère comprend deux segments, qui correspondent au côlon et au rectum de l'imago. Dès ce stade, les futures glandes rectales sont bien individualisées.

— entre l'uretère et le gésier, il existe également deux segments; le segment antérieur contient du vitellus, le segment postérieur en est totalement dépourvu (pl. 4, fig. 1). Ces deux parties sont séparées l'une de l'autre par une valvule qui oblitère presque complètement la lumière et qui est donc plus développée que celle de l'imago. Les cellules épithéliales du segment postérieur sont déjà revêtues d'une mince intima chitineuse, qui porte des ornementations en forme d'aiguilles; mais il n'existe encore ni papilles, ni « humeur noire ». Ces deux segments, antérieurs à l'uretère, correspondent donc à la région lisse et à la région à villosités du « mésentéron » au sens de Bordas. La présence d'une intima chitineuse recouvrant l'épithélium du segment à villosités dès les stades embryonnaires, de même que l'absence de vitellus dans sa lumière, démontrent l'origine embryologique différente du segment lisse et du segment à villosités. Ce dernier provient d'une invagination postérieure du tégument; son origine embryologique est la même que celle du côlon et du rectum.

E. Données histophysiologiques.

Depuis les travaux de Treherne (1958, 1959, 1962), il est bien établi que c'est l'intestin moyen qui représente chez de nombreux Insectes, dont

les Acridiens, la voie d'absorption des glucides, des lipides, des protides et d'une partie de l'eau. L'intestin postérieur est surtout impliqué dans l'absorption de l'eau et des ions, ainsi que l'ont démontré les travaux de Boné & Koch (1942), de Ramsay (1952 à 1955), de Bacetti (1960-1962), de Noirot & Noirot-Thimothée (1960), de Philips (1961). Il était donc indispensable de connaître celle des deux régions du « mésentéron » au sens de Bordas, qui constitue la voie d'absorption de molécules organiques, chez *Gryllus*. J'ai donc suivi le trajet de l'atome —^{35}S de mucoprotéines marquées par voie biologique.

Du radiosulfate de sodium est injecté à un Acridien, *Locusta migratoria ;* son tube digestif, dont le conjonctif est fortement radio-actif, sert de nourriture aux grillons. Après un repas unique et contrôlé, les grillons sont fixés par le liquide de Carnoy, et la radio-activité de leurs organes est recherchée par autoradiographie.

Quinze minutes après le repas, la radio-activité apparaît dans la lumière du jabot et dans celle du gésier. Au bout de trente minutes, le bol alimentaire atteint la lumière des caeca et du ventricule; en même temps l'apex des cellules ventriculaires devient radio-actif. Une heure après le repas, la lumière du segment à villosités s'emplit d'aliments radio-actifs, et le cytoplasme de l'épithélium du ventricule est entièrement marqué; l'hémolymphe devient alors radio-active. Au stade sept heures, l'épithélium des caeca est marqué à son tour, ainsi que le tissu conjonctif et les muscles de la paroi du segment lisse. L'« humeur noire » contient également des atomes de —^{35}S, mais non les cellules épithéliales du segment à villosités. Enfin, 24 heures après le repas, la radio-activité est généralisée à l'ensemble des organes.

Certes, ces expériences sommaires ne prétendent pas apporter de précisions sur la nature chimique des composés absorbés par la paroi intestinale. La méthode de l'histoautoradiographie ne révèle que des atomes et ne renseigne pas sur les combinaisons qui les contiennent. C'est donc seulement la voie d'absorption qui est mise en évidence, et encore ne doit-on tenir compte que des résultats obtenus à un stade *très précoce*, avant que l'hémolymphe soit envahie par les atomes radio-actifs. C'est pourquoi les observations effectuées à propos des cellules épithéliales du ventricule sont significatives; mais il n'en est pas de même en ce qui concerne l'épithélium des caeca, où la radio-activité, qui apparaît postérieurement à celle du milieu intérieur, peut résulter d'une réabsorption de composés préalablement absorbés ailleurs. Le fait à souligner est l'absence constante d'images d'absorption dans l'épithélium du segment à villosités; la radio-activité qui s'y manifeste tardivement, en même temps d'ailleurs que dans la plupart des organes, traduit plutôt l'activité métabolique de ses cellules à l'égard de substances radio-actives fournies par l'hémolymphe. Ainsi, segment lisse et segment à villosités doivent-ils avoir des significations physiologiques différentes : le premier représente une voie d'absorption importante pour les molécules organiques, il est l'homologue du mésentéron des Acridiens. Par ailleurs, chez le Grillon, seul l'épithélium de ce segment possède des enzymes histochimiquement

décelables. Il est bien certain qu'il sécrète également les diastases digestives qui ne peuvent être mises en évidence par les méthodes de l'histologie. Le segment à villosités, quant à lui, n'est sans doute, comme les autres régions du proctodeum, qu'une voie d'absorption de l'eau ou des petites molécules organiques.

F. Signification de l'uretère.

Chez les Acridiens, chaque faisceau de tubes de Malpighi est collecté par une « ampoule de réception » (Martoja, 1959), dont les cellules,

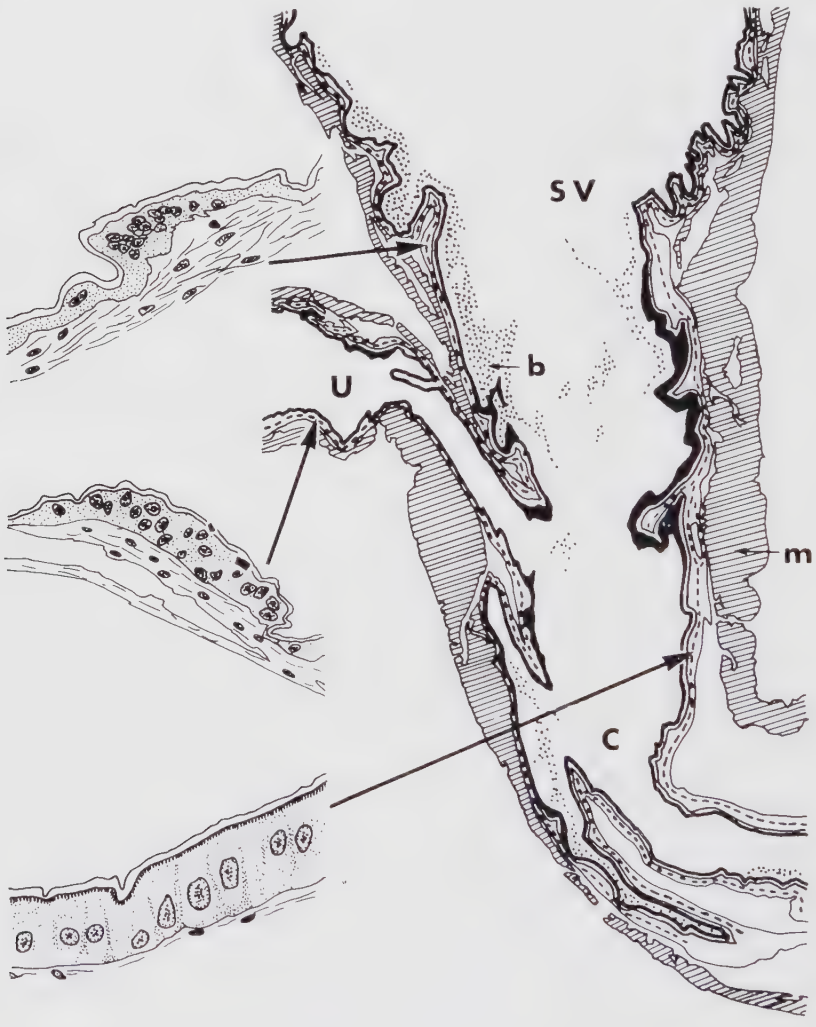


Fig. 3, Point d'abouchement de l'uretère, à la limite du segment à villosités et du côlon : SV : segment à villosités (région postérieure); C : côlon (région antérieure); U : uretère; m : muscles; b : bactéries.
Les 3 schémas de gauche sont des détails des 3 régions considérées.

comme celles des tubes eux-mêmes, possèdent une bordure en brosse et sont douées d'une activité phosphomono-estérasique alcaline. Chez les *Grylloidea*, l'homologue de ces ampoules est un réservoir unique qui collecte tous les tubes (ampoule ou vésicule collectrice, réservoir ou réceptacle urinaire, BORDAS, 1901-1913 — collecteur commun, BERKALOFF, 1960 (fig. 4); son ultrastructure et sa fonction sont identiques à celles du segment proximal des tubes de malpighi (BERKALOFF, 1960). Par contre, l'uretère possède des caractères épithéliaux très différents : ses cellules sont recouvertes d'une intima chitineuse (BORDAS, 1913; BERKALOFF, 1960). On sait que l'uretère provient d'une évagination de la paroi proctodéale, qui se réalise au cours du développement embryonnaire (BORDAS, 1913; ANDER, 1939) et qui entre en relations avec le collecteur commun. La partie proximale de cette évagination traverse la paroi de la région postérieure du segment à villosités, pour venir s'ouvrir à la limite antérieure du côlon (fig. 3). A l'éclosion, les cellules de l'uretère ne ressemblent à celles du côlon qu'au niveau du court segment qui est encore inclus dans la paroi digestive : l'épithélium de l'uretère, comme celui du côlon, est ici muni d'une intima épaisse et dentelée. Au-delà du tube digestif (pl. 8, fig. 7), l'épithélium est formé de cellules cubiques ou légèrement aplaties, à volumineux noyaux, dépourvues d'intima histologiquement visible, et rappelant les cellules cubiques de la paroi du segment à villosités des nouveau-nés (voir plus loin). Chez l'imago, il existe également des analogies entre épithélium de l'uretère et épithélium du segment à villosités : la hauteur cellulaire, la forme et les dimensions nucléaires rapprochent les cellules de l'uretère de celles de la partie postérieure du segment à villosités (fig. 3). Mais l'épithélium de l'uretère, contrairement à celui du segment à villosités ou à celui du côlon, est dépourvu de microvillosités (BERKALOFF, 1960).

Par conséquent, l'uretère du Grillon n'est qu'un diverticule latéral du segment à villosités. En fait, c'est le collecteur commun, défini plus haut, qui termine l'appareil excréteur. La limite entre l'appareil excréteur et le tube digestif se situe donc, en fait, au niveau antérieur, et non au niveau postérieur du segment à villosités (fig. 4).

G. NATURE DE L'« HUMEUR NOIRE » OU « REMBRUNIE ».

Ce liquide assez fluide, de couleur brune ou verdâtre, qui occupe un espace compris entre l'épithélium et la membrane péritrophique, a été interprété comme une sorte de chyle alimentaire destiné à être absorbé par les papilles (BORDAS, 1898; BERLESE, 1909). En fait, l'examen de frottis montre qu'il s'agit d'une importante culture naturelle de microorganismes, comprenant essentiellement des bactéries, et à laquelle je réserverai les termes de « suspension bactérienne » ou d'« amas bactérien », et dont les caractères sont énumérés plus loin. A l'exception de quelques moments très particuliers de la vie des grillons, cette suspension bactérienne est strictement localisée : vers l'avant, elle ne pénètre pas au-delà de la valvule proctodéale; vers l'arrière, rares sont les éléments

bactériens qui sont situés postérieurement au point d'abouchement de l'uretère. Dans tous les cas connus, les segments à micro-organismes extracellulaires et permanents, sont localisés dans le proctodeum. La présence de cette flore intestinale est un argument supplémentaire pour intégrer le segment à villosités au proctodeum.

Conclusion.

Les observations cytologiques et histochimiques, ainsi que les faits d'ordre histophysiologique ou embryologique, montrent que des différences profondes existent entre segment lisse et segment à villosités. Si l'on compare le segment lisse de *Gryllus* à l'intestin moyen des autres Insectes, et en particulier à celui des *Acridoidea* ou des *Tettigonioidae*, il faut admettre que lui seul représente le mésentéron. Par contre, les caractères du segment à villosités sont bien ceux d'une région proctodéale, qu'on peut interpréter comme un iléon modifié. La présence des papilles, qui confèrent à sa paroi une structure si originale, rappelle les descriptions des organes arborescents du proctodeum des coléoptères (Mingazzini, 1889), et plus particulièrement de l'iléon des imagos des *Melolonthinae* (Couturier, 1961). La localisation de la valvule proctodéale, en avant de ce segment, confirme sa signification anatomique. Il en résulte que, chez *Gryllus*, le point de jonction de l'uretère avec le tube digestif ne marque pas la limite entre intestin moyen et intestin postérieur; l'uretère rejoint l'appareil digestif à la limite de l'iléon et du côlon, soit au tiers antérieur du proctodeum. Mais l'uretère du Grillon n'est qu'un diverticule latéral du segment à villosités. L'iléon est bifide. La limite réelle de l'appareil excréteur se situe, en fait à l'extrémité distale de cet uretère,

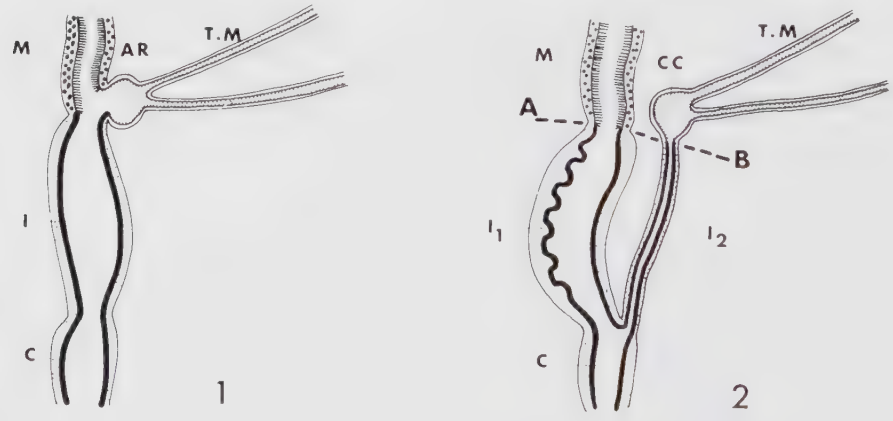


Fig. 4, Rapports anatomiques entre le tube digestif et l'appareil excréteur : 1 : *Acridoidea* (*Locusta migratoria*); 2 : *Grylloidea* (*Gryllus bimaculatus*); T. M. : tubes de Malpighi; AR : ampoule de réception; CC : collecteur commun; M : mésentéron; C : côlon; I : Iléon (*Acridoidea*); I_1 : segment à villosités (*Grylloidea*) ou iléon « principal »; I_2 : uretère (*Grylloidea*) ou « diverticule de l'iléon »; la ligne AB marque, chez *Gryllus*, la limite antérieure de l'iléon ou du proctodeum.

c'est-à-dire à la partie antérieure de l'iléon (fig. 4), comme chez tous les Insectes. Le principe des connexions, qui a amené les anciens auteurs à donner, du tube digestif, une interprétation erronée, n'est pas en défaut chez *Gryllus*. Il a seulement été appliqué d'une façon hâtive et sur les bases d'une confusion entre connexion apparente et connexion réelle.

Dans ces conditions, le mésentéron des grillons est beaucoup plus court qu'on ne l'admettait dans l'interprétation classique, alors que le proctodeum est plus long. Cette modification morphologique de l'iléon n'est pas en rapport avec l'absorption des produits de la digestion; l'axe des papilles, rempli d'hémolymphe, a pu faire croire à une fonction identique à celle des villosités de l'intestin des Vertrébrés, mais ce n'était que pure hypothèse.

Toutefois avant de poser la question de la signification fonctionnelle de l'iléon de *Gryllus*, il est nécessaire d'examiner la structure histologique de ce segment dans les autres familles d'Orthoptères, afin de déterminer dans quelles mesure les particularités relevées chez le Grillon sont bien caractéristiques du sous-ordre des *Grylloidea*.

II. — Caractères de l'iléon dans quelques groupes d'Orthoptères

L'interprétation anatomique du tube digestif des *Gryllacridoidea*, des *Tettigonioidea* et des *Acridoidea* n'a jamais fait l'objet de controverses. C'est que, dans ces groupes, les tubes de Malpighi ne sont pas collectés par un uretère. Les caractères cytologiques de l'iléon sont bien ceux d'un segment proctodéal; sa valvule antérieure est souvent très bien marquée. Par contre, chez tous les *Grylloidea*, il existe un uretère, dont il faut localiser le point d'abouchement.

Les espèces étudiées sont énumérées au tableau comparatif des hauteurs épithéliales (tabl. 3). Les résultats des observations histologiques peuvent être résumés de la façon qui suit.

A. Espèces dépourvues d'uretère.

Acridoidea. — La valvule proctodéale est bien individualisée, à la fois par sa taille, par le grand développement de son assise conjonctive (tissu conjonctif lâche) et par sa richesse en glycogène. La paroi de l'iléon ne présente aucune papille; sa hauteur atteint à peine la moitié de celle du mésentéron, mesurée dans sa partie rectiligne. Les cellules ont une striation apicale bien marquée sous l'intima chitineuse. Elles contiennent quelques granules de glycogène. Enfin, chez l'embryon, l'ébauche de ce segment est toujours dépourvue de vitellus.

Tettigonioidea. — La valvule proctodéale est, dans ce groupe, mal individualisée. L'iléon est dépourvu de papilles. Ses cellules épithéliales présentent les mêmes caractères que chez les *Acridoidea*, leur hauteur est également plus faible que dans l'intestion moyen.

Gryllacridoidea. — La valvule proctodéale est nettement dessinée. L'iléon, dépourvu de papilles, possède un épithélium plus bas que celui du mésentéron. Les caractères cytologiques sont les mêmes que pour l'iléon des *Acridoidea.*

Tableau 3. — Hauteur moyenne (en μ) de l'épithélium des deux segments du « mésentéron », chez les *Grylloidea*, du mésentéron (région postérieure) et de l'iléon, chez les autres Orthoptères (Imago).

	segment lisse (région postérieure du ventricule)	segment a villosités (régions plates)
Gryllus bimaculatus	130-150	30-40
Nemobius sylvestris	80-100	40
Gryllomorpha dalmatina	60	30
Gryllotalpa gryllotalpa	80	35
Mogoplistes squamiger	70	15 à 35 suivant régions
Oecanthus pellucens	45	45
	mésentéron (région postérieure du ventricule)	iléon
Tachycines asynomorus	70-100	70
Tettigonia viridissima	80	40
Pholidoptera griseoaptera	70	35
Locusta migratoria	50	25
Acrida nasuta	70	20
Pyrgomorpha conica	70	30
Anacridium aegyptium	100-120	40-50

B. Espèces possédant un uretère.

Grylloidea. — Le tube digestif des *Nemobiinae* a été interprété par Bordas, de la même manière que celui de *Gryllus.* Aux dimensions près, la description histologique de l'iléon de *Gryllus* est valable pour *Nemobius sylvestris.* Les bactéries y sont également abondantes.

Gryllotalpidae. — A l'exception de Carpentier (1937) et de Ander (1939) qui adoptent pour la Courtilière l'interprétation de Bordas pour les Gryllides, la plupart des anatomistes ont fait du segment à villosités une région proctodéale, le reste de l'intestin postérieur étant « l'intestin à cryptes » (fig. 5). Récemment, des arguments parasitologiques sont venus s'ajouter aux données histologiques des anciens auteurs (Frenzel, 1886) et renforcer la thèse de l'origine proctodéale du segment à villosités (Stammer, 1950) : on sait que les Oxyurides de la famille des *Thelastomatidae* ne parasitent que l'intestin postérieur des Arthropodes. Selon l'interprétation anatomique de Carpentier et de Ander, les Courtilières semblaient constituer une exception à la règle, car elles hébergent les parasites à la fois dans l'intestin à cryptes et dans le segment à villosités, donc à la fois dans le mésentéron et dans le proctodeum. Pour Stammer, la seule observation des parasites dans le segment à villosités suffit à prouver que cette région du tractus digestif ne peut appartenir à l'intestin moyen. Mes observations histologiques confirment le point de vue du parasitologiste : la paroi du segment est tout à fait comparable à celle de l'iléon

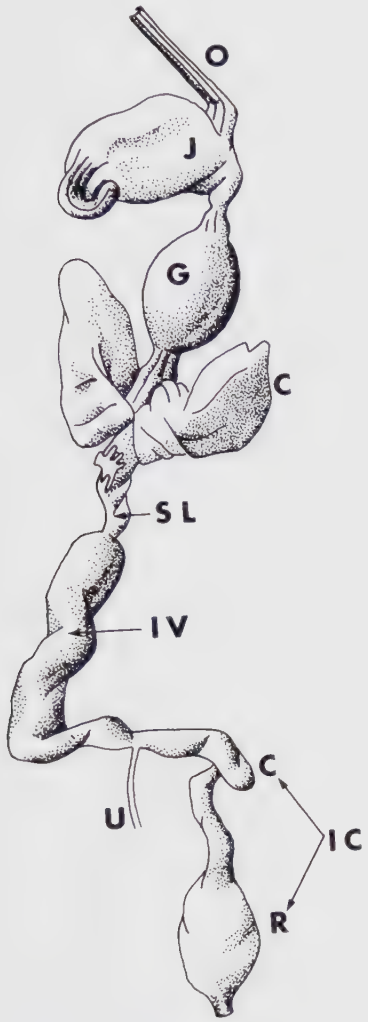


Fig. 5, Anatomie du tube digestif de *Gryllotalpa gryllotalpa* :

O : œsophage; J : jabot; G : gésier; C : caecum (mésentéron); SL : segment lisse (mésentéron); IV : intestin à villosités (iléon); IC : intestin à cryptes (C : côlon; R : rectum); U : uretère.

des grillons et, sur certains exemplaires, j'ai effectivement observé les parasites dans la lumière de ce segment. De plus, le segment à villosités de la Courtilière constitue également une poche à bactéries, mais par suite de l'absence de membrane péritrophique, les papilles sont beaucoup moins individualisées que chez le Grillon, et font saillie dans le bol alimentaire.

Oecanthidae. — Le segment à villosités constitue également un segment à bactéries. Mais les papilles sont très petites (hauteur 45 μ),

et sont encastrées entre les cellules banales de la paroi, exceptionnellement hautes (45 μ).

Mogoplistidae. — Il existe un segment à villosités comparable à celui des *Gryllidae*, tant par l'abondance de la suspension bactérienne que par le grand nombre des papilles. Celles-ci sont petites et grêles et n'ont que 20 μ de hauteur. Entre elles, les cellules sont soit cubiques (hauteur 35 μ), soit très plates (hauteur 15 μ).

En résumé, le tube digestif des *Grylloidea* possède toujours un segment à papilles dont la signification fonctionnelle est celle d'une poche à bactéries. Le tube digestif des *Tettigonioidea*, *Gryllacridoidea*, *Acridoidea*, ne comporte pas un tel segment. La hauteur épithéliale du segment à papilles des *Grylloidea* atteint à peine la moitié de celle du segment lisse, sauf chez les *Œcanthidae*, qui se situent en marge des autres familles (cf. les caractères de leur corps gras, Martoja & Lauverjat, 1965). Chez les autres Orthoptères, *Tettigonioidea*, *Gryllacridoidea*, *Acridoidea*, les rapports des hauteurs entre épithélium du mésentéron et épithélium de l'iléon, sont exactement du même ordre. Le fait constitue un argument supplémentaire pour voir dans le segment à villosités des *Grylloidea*, l'homologue de l'iléon des autres groupes d'Orthoptères (*).

Chez les *Grylloidea*, c'est-à-dire chez les Orthoptères où la liaison entre système digestif et appareil excréteur est réalisée par l'intermédiaire d'un uretère, le segment qui précède le point d'abouchement de ce canal dans l'intestin présente d'une part des villosités, et d'autre part, des plis très particuliers de la paroi, les papilles. Il est l'homologue de l'iléon des autres Orthoptères et appartient donc au proctodeum. Les deux interprétations formulées, l'une à propos des grillons, l'autre à propos des courtilières, pouvaient difficilement coexister à l'égard du système anatomique dont l'aspect est identique dans les diverses familles des *Grylloidea*. Des deux théories proposées, c'est la plus couramment acceptée, celle de Bordas, qui doit être rejetée. L'épithélium de l'iléon des *Grylloidea* est toujours profondément modifié au niveau des papilles, alors que dans les régions intercalaires, il possède de nombreux points communs avec celui de l'iléon des autres Orthoptères. Les striations de l'apex cellulaire traduisent l'existence d'un système d'invaginations de la cytomembrane (microvillosités). De tels systèmes ont déjà été décrits par Bacetti dans l'iléon d'un Acridien (*Aiolopus strepens*, 1960), ainsi que par Noirot & Noirot-Timothée chez *Gryllus domesticus* (1960), dans une région qui ne pouvait être clairement définie par les auteurs, et qui pourrait correspondre au côlon. Dans tous les cas, on a interprété cette structure de la cellule proctodéale comme étant liée à une réabsorption d'eau. Sans doute les cellules du segment à villosités des *Grylloidea*

(*) Il n'a pas été tenu compte, ici, de la famille des *Myrmecophilidae*, dont je n'ai pu examiner aucun représentant. Selon Schimmer (1909) il n'existe pas de segment à villosités, et la partie postérieure au point d'abouchement de l'uretère comprend 3 régions (iléon, côlon et rectum). Le proctodeum n'a malheureusement pas été étudié par les méthodes histologiques. Aussi serait-il nécessaire, avant de discuter de la très grande originalité de cette famille, de reprendre l'étude histologique du conduit digestif des Myrmecophiles.

peuvent-elles également jouer un rôle important dans l'absorption de l'eau et des petites molécules, minérales ou organiques.

La morphologie des papilles rappelle les « organes arborescents » du proctodeum des Coléoptères auxquels est associée une riche flore bactérienne. Chez les *Grylloidea*, le segment à papilles constitue également un « segment à bactéries ». Une concordance entre ces papilles et la présence d'une abondante flore intestinale existe-t-elle chez les Orthoptères? Dans le cas contraire, une flore très développée peut-elle se maintenir dans la lumière intestinale en l'absence de différenciations spéciales de la paroi digestive? La réponse à ces questions exige une recherche préalable de micro-organismes dans la lumière du tube digestif d'Orthoptères dont l'appareil digestif est plus simple que chez les *Grylloidea*.

LES BACTÉRIES INTESTINALES CHEZ LES GRYLLACRIDOIDEA LES TETTIGONIOIDEA ET LES ACRIDOIDEA

Le problème étant de déterminer la localisation des germes éventuels et non d'entreprendre une étude bactériologique, leur recherche a été effectuée sur coupes histologiques colorées par le trichrome de Ramon y Cajal. Les faits suivants ont pu être dégagés.

I. — Acridoidea.

Espèces étudiées : *Schistocerca gregaria*;
Anacridium aegyptium;
Locusta migratoria;
Œdipoda coerulescens;
Tetrix tenuicornis;
Acrida nasuta.

Chez la plupart des individus, et pour toutes les espèces examinées, il existe quelques foyers microbiens au contact des aliments, dans le mésentéron et l'iléon, parfois aussi dans le côlon et le rectum; les germes existent également à l'intérieur du bol alimentaire; chez quelques animaux, ils sont exceptionnellement abondants. Ce n'est qu'assez rarement qu'on observe de petits foyers dans les segments intestinaux en état de vacuité : le fait a été observé chez *Acrida*, où des bactéries sont situées dans de profonds replis de l'iléon.

II. — Tettigonioidea.

Espèces étudiées : *Metrioptera roeseli*;
Decticus verrucivorus;
Pholidoptera griseoaptera;
Tettigonia viridissima;
Conocephalus fuscus.

Chez toutes ces espèces, d'importants foyers bactériens, plus développés que chez les Acridiens et formant souvent de larges nappes, sont logés dans le bol alimentaire, ou accolés à lui (pl. 6, fig. 5 et 6). Ils existent au niveau du mésentéron et du proctodeum, surtout dans l'iléon.

III. — Gryllacridoidea. Tachycines asynomorus.

De petits foyers microbiens, ou bien de nombreux germes épars, sont accolés au bol alimentaire, dans tous les segments intestinaux.

En résumé, le tube digestif des Orthoptères autres que les *Grylloidea*, héberge, dans sa lumière, de nombreuses bactéries. Celles-ci ne sont pas situées dans un segment particulier du tractus digestif et, corrélativement, aucune région intestinale ne présente de modification histologique particulière. Comme les nappes bactériennes sont situées le plus souvent à l'intérieur du bol alimentaire, ou à la rigueur à son contact, il est probable que beaucoup de ces microbes sont ingérés en même temps que les aliments, et que leur origine est donc externe. Certains sont sans doute digérés, sauf ceux qui atteignent le proctodeum. En dehors des périodes digestives, quelques-uns peuvent se maintenir dans des replis de la paroi qui sont de simples villosités et peut-être représentent-ils une flore permanente. Certaines données expérimentales exposées plus loin sont en faveur du maintien de bactéries dans la lumière proctodéale. Mais, même en ce cas, il ne s'agit que d'une flore numériquement faible. Contrairement à la suspension bactérienne des *Grylloidea*, qui est par ailleurs intensément pigmentée, cette flore des autres Orthoptères passe toujours inaperçue à l'examen anatomique.

Les modifications de la paroi de l'iléon des *Grylloidea* (papilles), semblent donc bien représenter une spécialisation très poussée de ce segment, spécialisation qui serait en relation avec le maintien d'une importante flore bactérienne. Grâce à l'existence d'un uretère dont l'effet est de reporter, au-delà de l'iléon, le débouché de l'appareil excréteur, les micro-organismes se trouvent en dehors du circuit des produits d'excrétion. On peut par conséquent admettre que l'uretère rentre dans le cadre de cette spécialisation.

LA FLORE BACTÉRIENNE DES GRYLLOIDEA ET SON IMPORTANCE DANS LA PHYSIOLOGIE DE L'HOTE

L'étude comparée de la répartition de la flore bactérienne chez les Orthoptères, montre le caractère exceptionnel des *Grylloidea* à cet égard. Elle permet de pressentir l'intérêt que présente l'association biologique existant entre l'Insecte et les micro-organismes. Le problème a été abordé à la fois par l'étude des germes et par l'étude de l'hôte.

I. — Les bactéries de l'iléon de Gryllus

L'étude des micro-organismes comporte un examen de la suspension bactérienne, l'analyse de son évolution au cours du développement larvaire et de ses modifications consécutives au déroulement du cycle digestif ou à l'application de certains traitements expérimentaux.

A. Localisation et nature des germes.

La suspension bactérienne occupe un vaste espace situé entre l'épithélium intestinal et la membrane péritrophique qui, sur la plus grande longueur de l'iléon, se trouve décollée de la paroi intestinale. Les germes ne sont donc pas localisés uniquement, comme c'est le cas chez les *Melolonthinae*, au contact des papilles; la plus grande partie de la flore est même située entre les papilles, ou dans des régions qui en sont dépourvues. Le volume de la suspension bactérienne peut représenter environ la moitié du segment à villosités (fig. 6). Les papilles, qui baignent dans la suspension, contribuent sans doute à assurer le maintien de l'espace occupé par les germes, en évitant l'accolement de la membrane péritrophique à l'épithélium.

Au laboratoire, où les grillons sont nourris de végétaux frais, de même que dans la nature, la couleur de la suspension bactérienne est brunâtre ou verdâtre. Ce caractère est lié au régime alimentaire, et il est possible de modifier la couleur de l'amas bactérien en modifiant le régime : l'addition de betterave cuite aux aliments fait virer au rouge la teinte de l'amas bactérien. Le pH du contenu de l'iléon, mesuré au pH-mètre à microélectrodes, apparaît plus alcalin que celui des autres segments intestinaux; le tableau suivant en donne les valeurs pour les divers segments digestifs de *G. bimaculatus*, et ces résultats sont comparés à ceux d'Evans & Payne (1964) chez *Schistocerca*, et de Grassé & Noirot

		Gryllus bimaculatus	*Schistocerca gregaria*	*Reticulitermes lucifugus*
Stomodeum		4,30	5,5	5,6
Mésentéron	Caeca	7,00	6,1	6,8 à 7,2
	Ventricule		6,2 à 7,1 selon niveau	
Proctodeum	Iléon	7,42	7,0	Panse rectale 7,4
	Côlon	6,80		Reste du Proctodeum : 5,0
	Rectum			

(1945) chez *Reticulitermes*. Alors que chez *Schistocerca*, le pH de la partie postérieure du ventricule diffère peu de celui du proctodeum, l'iléon de *Gryllus* est beaucoup plus alcalin que le segment qui le précède (mésentéron) ou que celui qui lui fait suite (côlon). Cette alcalinité est évidemment liée à l'existence des germes intestinaux; chez les Isoptères et les

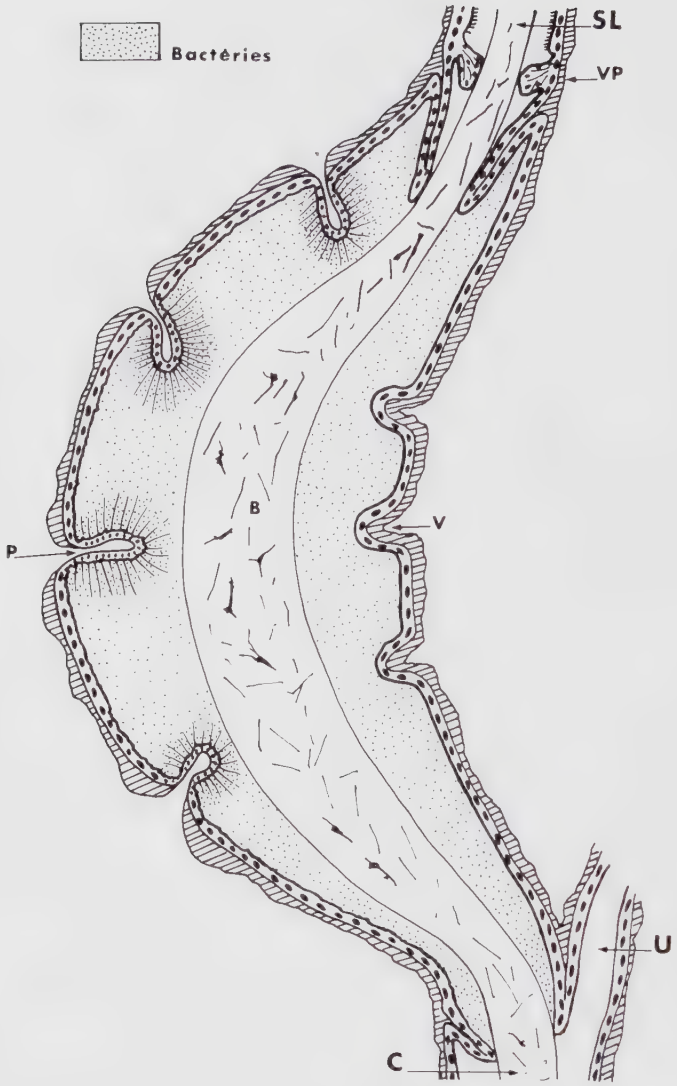


Fig. 6, Schéma du segment à villosités de *Gryllus bimaculatus* :
SL : segment lisse (mésentéron); VP : valvule proctodéale; V : villosité; P : papille; C : côlon; U : uretère; B : bol alimentaire.

Coléoptères, les segments à micro-organismes ont également un contenu alcalin (Grassé & Noirot, 1945; Rössler, 1961).

Les éléments de la flore intestinale sont actuellement en cours de détermination (*). D'après les auteurs (Vierne & Meynadier, sous presse), « la flore de l'iléon de *G. campestris*, *G. bimaculatus*, et *G. domes-*

(*) Travail effectué au Laboratoire de Cytopathologie, I.N.R.A., Saint-Christol-les-Alès (Gard).

ticus n'est jamais homogène. L'essentiel de la masse est représentée par des coccobacilles Gram — et des coccis Gram $^+$; les bacilles y sont intimement mêlés » (pl. 6, fig. 7 et 8). Six couches ont été isolées de l'iléon de *G. campestris*, mais il est probable que l'inventaire n'est pas encore achevé. Ont été détectées, une mycobactérie (*Corynebacterium* sp.), une bactériale (*Cillopasteurella* sp.), deux bacillales (*Bacillus thermocellulolyticum*, *B. megaterium*), deux micrococcales (deux souches de *Staphylococcus* non identifiées). Ces germes donnent des colonies blanches ou rosées, ils ne sont donc pas la cause de la coloration brun-verdâtre de la culture de l'iléon. D'ailleurs après centrifugation, le surnageant, qui représente le milieu de culture naturel, est coloré. Accessoirement, il existe d'autres micro-organismes, comme des kystes de grégarines, ou des formes nucléées, très rares, qui pourraient être des levures ou des microsporidies. Bien que nous ne possédions à l'heure actuelle que très peu de données bactériologiques sur les flores proctodéales des Insectes, il semble exister des différences notables entre les espèces. A ma connaissance, seules les bactéries de l'iléon de *Melolontha melolontha* ont été cultivées et déterminées (Couturier, 1961), mais alors que la flore de l'iléon du hanneton est homogène et comprend uniquement des formes Gram négatives de la tribu des *Escherichieae*, celle de l'iléon des grillons est hétérogène et comprend un mélange de formes Gram négatives et Gram-positives.

Les affinités tinctoriales et les caractères histochimiques de la suspension bactérienne ont pu être étudiés par les méthodes de l'histologie appliquées à des coupes d'iléon : la densité microbienne est toujours suffisamment élevée pour qu'il soit possible d'obtenir des colorations intenses. Les affinités tinctoriales, les caractères histochimiques et les résultats des recherches d'enzymes figurent dans le tableau 4. On remarque que, pour certaines colorations mixtes, comportant un colorant nucléaire et un ou plusieurs colorants du cytoplasme (méthodes trichromes, mélange de Unna), l'amas bactérien retient les deux types de colorants, résultat qui peut être attribué à la coloration simultanée du cytoplasme et des corps chromatiniens. Ces derniers sont décelables, par les réactions nucléales, bien que l'intensité obtenue soit toujours très faible. Les méthodes de détection des mucopolysaccharides acides donnent des résultats fortement positifs, résultats qui pourraient être rapportés à la coloration des coques bactériennes (Mowry & Winkler, 1956); sur frottis, en effet, le bleu alcian colore la périphérie des germes. Enfin, la plupart des méthodes signalétiques des groupements protidiques colorent avec intensité l'amas bactérien. Quand l'hôte reçoit une injection de radiosulfate de sodium, de DL-méthionine-^{35}S ou de chlorhydrate de cystéine ^{35}S, la suspension devient radioactive surtout si c'est l'isotope minéral qui a été injecté. Dans le cas des amino-acides radioactifs, il s'agit évidemment d'un marquage des protides soufrés; mais dans le cas de l'isotope minéral, la détermination de la forme chimique où est engagé le soufre-35, nécessite quelques recherches complémentaires qui seront exposées en même temps que les résultats relatifs au métabolisme du soufre. La suspension bactérienne contient parfois de nombreux granules dont le

TABLEAU 4. — PRINCIPALES AFFINITÉS TINCTORIALES ET CARACTÈRES HISTOCHIMIQUES DE LA SUSPENSION BACTÉRIENNE DE L'ILÉON DE *Gryllus bimaculatus*.

MÉTHODES OU COMPOSÉS IDENTIFIÉS	RÉSULTATS
Trichrome de Prenant	brun-rose.
Trichrome de Cajal	rouge.
Trichrome en un temps	rose.
Azan	grise, avec éléments rouges.
Réactions nucléales	±
Vert de méthyle-pyronine	violette (ADN + ARN)
Composés A.P.S.-positifs	− − −
Glycogène	parfois (foyers bactériens des papilles).
Mucopolysaccharides acides :	
Bleu alcian	+ − −
Hale	+ + +
Métachromasie	β, tendance à γ après Bouin.
α amino-acides	− −
Amino-acides phénoliques	+ − −
Tyrosine	−
Amino-acides sulfhydrilés	− −
Fuchsine-paraldéhyde	parfois grains + (chromolipoïdes).
Noir soudan B	parfois grains + (chromolipoïdes).
Acide urique	−
Acétylnaphtolestérases	+ + +
Tween-40 estérases	− − −
Tween-60 estérases	−
Tween-80 estérases	− − −
Phosphomono-estérases alcalines	±
Radioactivité après injection de :	
radiosulfate de Na	− − −
DL-méthionine-^{35}S	−
chlorhydrate de cystéine-^{35}S	+

diamètre va de 1 à 10 μ, et dont la teinte, en l'absence de coloration, est jaune après fixation au Carnoy. Ils sont colorables par la fuchsine-paraldéhyde et par le bleu de toluidine (teinte orthochromatique). Ils sont riches en groupements réducteurs et adsorbent le noir Soudan B. Il s'agit vraisemblablement de chromolipoïdes. Ces pigments ne sont pas mêlés de façon constante aux bactéries; mais lorsqu'ils existent, ils sont toujours très nombreux (pl. 5, fig. 1).

La recherche de quelques enzymes montre qu'au niveau de la suspension bactérienne, les activités phosphomono-estérasiques sont très faibles alors que les activités aliestérasiques sont élevées. Il existe une lipase spécifique, une acétylnaphtolestérase et des estérases non spécifiques hydrolysant stéarates et palmitates (tweens-40 et 60).

Pour la plupart des méthodes histochimiques ou enzymologiques mises en œuvre, le problème se pose de savoir si les résultats positifs sont le fait des germes eux-mêmes ou du milieu de culture naturel dans lequel ils vivent. Certaines des méthodes (Mann-Dominini, par exemple) ne colorent que les bactéries. Pour d'autres techniques on remarque un aspect granuleux des préparations, qui explique que les germes sont plus intensément colorés que le milieu qui les entoure. Enfin, pour de nombreuses méthodes (réaction au D.D.D., tétrazoréaction, toutes les techniques de l'histo-enzymologie), la teinte uniforme obtenue ne permet pas d'observer la localisation exacte des composés détectés.

TABLEAU 5. — RÉPARTITION, DANS LES MICRO-ORGANISMES ET DANS LEUR MILIEU DE CULTURE, DE QUELQUES COMPOSÉS HISTOCHIMIQUEMENT DÉCELABLES.

	BACTÉRIES	MILIEU DE CULTURE NATUREL
COMPOSÉS APS-POSITIFS	+++	—
Mucopolysaccharides acides :		
Métachromasie : bleu alcian	coques +++	—
Métachromasie : sans prétraitement	la plupart γ	—
Métachromasie : après méthylation (4 h à 37°)	—	—
Métachromasie : après méthylation + saponification	—	—
α-amino-acides	+	+++
Protides sulfhydrilés (-SH)	+	+ + +
Amino-acides phénoliques	+	+ + +
A.D.N. + A.R.N. (Unna)	violet	incolore

En résumé, l'ensemble de la suspension bactérienne est riche en groupements protidiques, en mucopolysaccharides acides et en certaines enzymes du métabolisme général. On y trouve parfois des chromolipoïdes, rarement du glycogène localisé parmi les bactéries des villosités. La couleur naturelle de la suspension est brun verdâtre foncé, mais les colonies bactériennes n'ayant jamais cette teinte, elle est due au milieu de culture naturel de l'iléon.

L'application de certaines techniques histochimiques à des frottis fixés au Carnoy a permis de préciser la localisation de ces composés. Les résultats obtenus sont groupés dans le tableau 5. De ces données, il apparaît que le milieu de culture naturel des micro-organismes est riche en protides, mais qu'il est dépourvu de mucopolysaccharides acides. Ceux-ci sont localisés dans les coques bactériennes; ils ne sont pas de nature carboxylée; leurs groupements anioniques peuvent être des sulfates ou des phosphates.

B. ÉVOLUTION DE L'ILÉON ET DE SA FLORE AU COURS DE LA VIE LARVAIRE.

Les modifications du segment à villosités ont été étudiées sur des coupés sériées de larves de divers âges. Seuls les faits d'ordre histologique ont été envisagés à l'exclusion de toute considération sur la croissance, dont les méthodes d'étude relèvent de la statistique.

1. L'iléon à l'éclosion

L'iléon mesure 70 μ de hauteur pour 150 μ de largeur. Il a la forme d'une calotte dont la zone antérieure recouvre la région terminale du mésentéron (pl. 4, fig. 1). Au delà de la zone de recouvrement, la calotte est incomplètement divisée en deux hémisphères (un droit et un gauche) par un important pli ventral (pl. 4, fig. 2). L'iléon est séparé du mésentéron par une valvule proctodéale très développée. La paroi du segment est constituée de deux types cellulaires : sur la plus grande surface de l'organe, les cellules épithéliales sont très petites et plates; elles ont un noyau

anguleux et un cytoplasme peu abondant (pl. 4, fig. 5). Elles portent à leur extrémité apicale des aiguilles chitineuses courtes et épaisses. Certaines de ces cellules sont groupées en petits bouquets munis d'aiguilles chitineuses longues (10 μ), qui n'évoquent que de façon très lointaine les futures papilles (pl. 4, fig. 4). Ces bouquets sont nombreux dans la partie antérieure du segment, au voisinage de la valvule proctodéale (pl. 4, fig. 3). Les cellules du deuxième type sont cubiques, hautes de 15 μ et possèdent un volumineux noyau sphérique ou ovoïde, riche en chromatine. Aucune différenciation apicale n'est visible. Ces cellules cubiques forment des plages où les noyaux sont très nombreux; elles sont bien représentées à l'apex du pli ventral et sur les bords latéraux de l'iléon; ailleurs, elles ne constituent que de petits amas parmi les cellules du premier type (pl. 4, fig. 3 et 4).

A ce stade, la lumière de l'organe est complètement vide, et la hauteur des cellules cubiques est beaucoup plus grande que celle des cellules du mésentéron.

2. L'iléon quelques heures après l'éclosion

L'allure du segment reste la même mais la lumière se remplit de débris alimentaires. Des éléments granuleux, dont certains pourraient être de nature bactérienne, sont visibles parmi les aiguilles chitineuses des cellules plates.

3. L'iléon à la fin du premier stade larvaire (4 jours après l'éclosion)

Les deux types cellulaires de la paroi se retrouvent à ce stade, mais, par suite de l'augmentation de taille de l'organe, les cellules cubiques apparaissent beaucoup moins tassées : l'aspect d'un épithélium simple est réalisé (pl. 4, fig. 6). Aucune différenciation n'est encore visible à l'apex de ces cellules. La hauteur des cellules cubiques (15 μ) n'est plus supérieure à celle de l'épithélium du mésentéron.

4. L'iléon au deuxième stade (milieu de l'intermue)

Par suite de l'augmentation de volume du segment, la paroi paraît relativement beaucoup plus mince. Les cellules cubiques ont déjà le même aspect que chez l'imago; leur auteur (15 μ) n'est que la moitié de celle de l'épithélium du mésentéron mesurée dans la partie postérieure du ventricule et la striation apicale est nette. La valvule proctodéale, très développée, est constituée d'un anneau antérieur de 60 μ de long, à cellules aplaties, et prolongé par de volumineux plis de la paroi de l'iléon.

L'espace bactérien est déjà très développé. La suspension bactérienne, brun verdâtre, est très riche en bactéries, dont certaines forment des foyers parmi les aiguilles chitineuses des cellules plates. Sa localisation est limitée à l'iléon (pl. 4, fig. 7).

5. Au troisième stade larvaire

Les seules modifications par rapport au stade précédent, sont représentées par les ébauches des papilles qui forment des amas cellulaires munis de longues aiguilles chitineuses.

6. Quatrième stade
(4 jours après la mue)

L'aspect de la valvule proctodéale et les caractères de la paroi de l'iléon, ont peu varié. Mais les papilles sont nettement dessinées : leur hauteur est de 30 μ sans compter les expansions chitineuses, leur largeur n'est que de 10 μ, et leur axe est très étroit. Alors que les cellules cubiques ont des noyaux sphériques de 12 μ, un cytoplasme acidophile, les cellules des papilles ont des noyaux très allongés (6 × 1 μ) et un cytoplasme basophile. Le nombre des papilles est encore très réduit; elles n'existent que sur le bord antérieur gauche du segment.

7. Cinquième stade

Les papilles, qui sont toutes situées sur la face convexe de l'organe, près de la valvule proctodéale, restent peu nombreuses et très grêles (pl. 4, fig. 8). Elles sont séparées par des régions à cellules plates (hauteur 5 μ). Dans les parties dépourvues de papilles et de cellules plates, les cellules cubiques ont 15 à 20 μ de hauteur, soit la moitié de la hauteur de l'épithélium du mésentéron. La valvule proctodéale ne s'est pas modifiée. La suspension bactérienne est abondante.

8. Sixième stade (pl. 4, fig. 9 et 10)

La densité des papilles est plus grande; leur forme est plus globuleuse, leur hauteur atteint 45 μ.

9. A partir du huitième stade

Il n'existe plus de cellules plates. Les papilles, qui sont globuleuses et d'assez grande taille (120 × 70 μ), sont séparées les unes des autres par des cellules cubiques. En dehors des papilles, l'épithélium ne comporte donc plus qu'un seul type cellulaire, si bien que, aux dimensions près, l'iléon a déjà l'aspect qu'il aura chez l'imago. Au cours des stades suivants (protonymphe et deutonymphe) il subira seulement une augmentation de taille. Il en est de même pour les papilles qui atteignent 250 μ de hauteur au début du stade deutonymphal.

En résumé, au début de la vie larvaire, l'iléon est dépourvu de papilles. Dans la région de l'organe où elles apparaîtront, la paroi est constituée des cellules plates munies de longues aiguilles chitineuses, et qui sont parfois groupées en bouquets. Ce type cellulaire disparaît au fur et à mesure que les papilles se différencient. La réalisation d'un iléon de « type imaginal » est très progressive, et elle est achevée au 8e stade larvaire. Sans doute les longues aiguilles chitineuses de la paroi jouent-elles un

rôle dans la fixation des germes de la flore. A cet égard, cellules plates et cellules des papilles auraient une fonction identique, et ceci peut expliquer que la disparition des premières va de pair avec l'apparition des secondes. Quant à la flore intestinale, elle envahit le segment au cours du premier stade, d'ailleurs très court (3 jours); elle est en place au début du deuxième stade.

C. La flore intestinale au cours du cycle digestif.

L'étude du segment à villosités a montré que la flore intestinale était localisée dans la lumière de l'iléon. Pourtant, cette situation ne représente, en quelque sorte, qu'un état moyen. Les germes peuvent quitter l'espace bactérien, ou même l'iléon, et parvenir occasionnellement dans d'autres segments digestifs. C'est ce qui se produit au cours du

Légendes de la planche

PLANCHE IV

Évolution de l'iléon au cours de la vie larvaire, chez *G. bimaculatus*.

Fig. 1, Coupe transversale d'un embryon à l'éclosion (Acide periodique-Schiff-hémalun-picro-indigocarmin, 160 diamètres). Région dorsale à droite du cliché. SL : segment lisse, avec vitellus (en noir); SV : segment à villosités, dépourvu de vitellus.

Fig. 2, Coupe plus postérieure, n'intéressant, pour la partie digestive, que le segment à villosités. Remarquer, à l'apex d'un pli ventral (flèche), et sur un bord latéral, les hautes cellules cubiques.

Fig. 3, 4 et 5, Détails de la paroi du segment à villosités, à l'éclosion (Trichrome de Prenant).

3 : cellules sans expansions chitineuses (futures cellules cubiques à droite; cellules à aiguilles chitineuses à gauche (600 diamètres).

4 : bouquets de cellules à aiguilles chitineuses (1300 diamètres).

5 : cellules plates (1 300 diamètres).

Remarquer, sur les trois clichés, l'absence de suspension bactérienne dans la lumière (L).

Fig. 6, Iléon à la fin du premier stade, 4 jours après l'éclosion (Hémalun-picroindigocarmin, 330 diamètres). Remarquer l'alignement régulier des cellules cubiques de la paroi, le grand développement du bol alimentaire (à gauche), l'absence de suspension bactérienne dans le futur espace à bactéries (E).

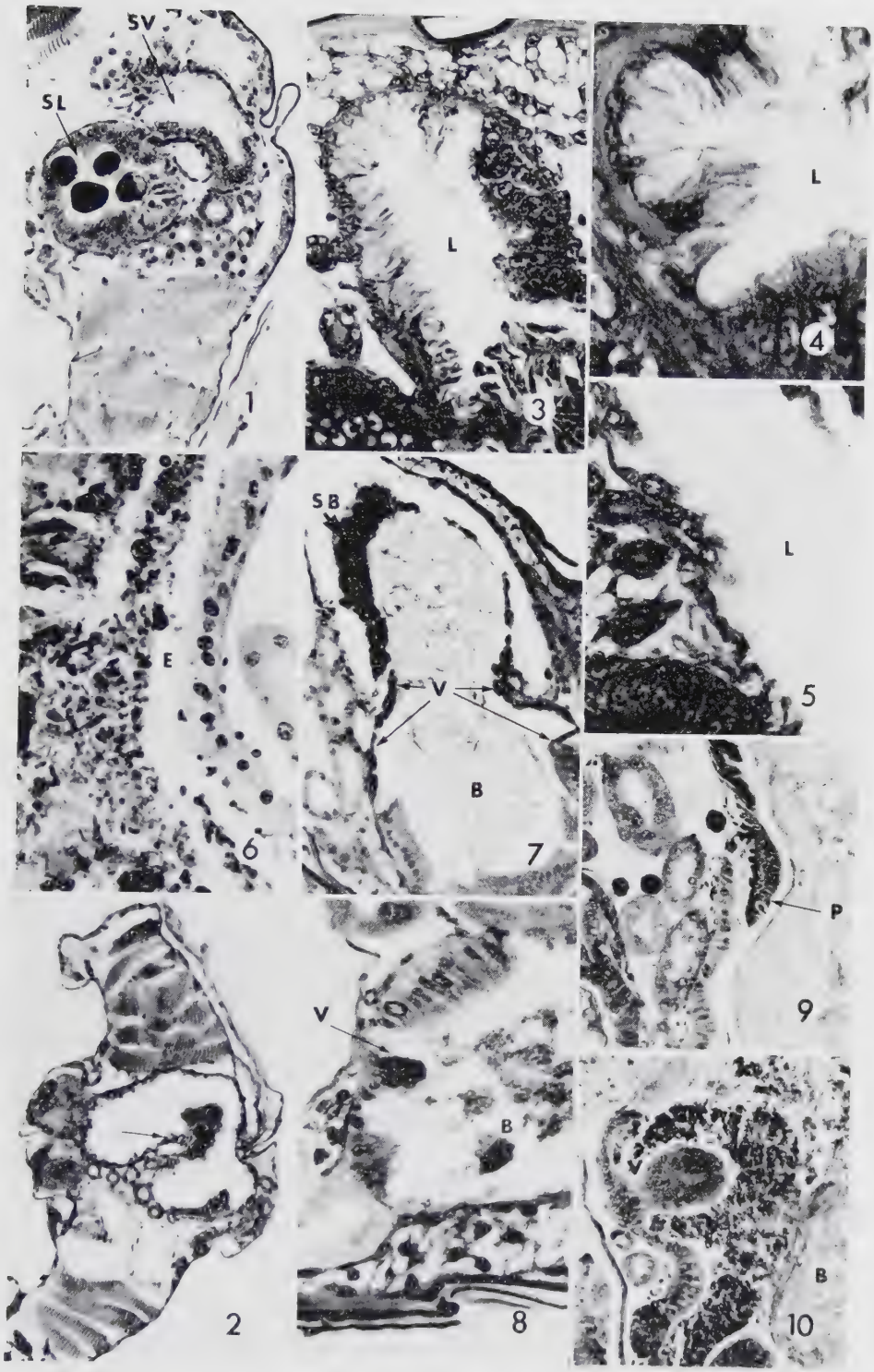
Fig. 7, Coupe longitudinale d'une larve de 2e stade, à la limite du segment lisse et du segment à villosités (Trichrome de R. y Cajal, 150 diamètres). SL : segment lisse; B : bol alimentaire; V : valvule proctodéale et plis antérieurs de l'iléon. Remarquer l'abondance de la suspension bactérienne (SB).

Fig. 8, Région antérieure de l'iléon, au 5e stade larvaire (Trichrome de Prenant, 130 diamètres). Entre deux groupes de cellules cubiques, une villosité (V); bactéries en B.

Fig. 9 et 10, 6e stade larvaire (Trichrome de Prenant, 130 diamètres) :

9 : limite entre segment lisse et segment à villosités, avec le pli (P) marquant le début de l'iléon. Remarquer les cellules cubiques (C) d'aspect analogue à celles de l'imago.

10 : niveau d'une villosité (V), entourée de nombreuses bactéries. Bol alimentaire en B.


SV
SL
1
L
3
L
4
E
6
SB
V
B
7
L
5
P
9
V
B
8
V
B
10
2

cycle digestif où trois sortes de migrations des bactéries ont pu être reconnues :

— Une migration à travers la membrane péritrophique. Au cours de son passage dans l'iléon, le bol alimentaire se charge de micro-organismes. Ils y sont rares 4 h après le repas; au bout de 24 h le bol alimentaire qui occupe encore la lumière de l'iléon est envahi par les bactéries.

— Une migration vers l'extrémité anale. Les germes qui ont pénétré dans l'aliment, le suivent au cours de son cheminement vers les segments postérieurs du proctodeum. D'autres constituent des nappes importantes accolées à l'extérieur de la membrane péritrophique; comme les germes mêlés aux aliments, ces nappes seront éliminées avec les excréta. Les frottis d'excréta sont toujours très riches en bactéries intestinales.

— Une migration vers le mésentéron. 18 h après le repas, d'importantes nappes bactériennes sont refoulées, vraisemblablement par le jeu des mouvements péristaltiques de l'intestin, dans la lumière du mésentéron. Peut-être y subissent-elles une digestion, comme chez la larve d'*Oryctes* (Rössler, 1961). Pourtant les enzymes digestives sont inactives à l'égard de nombreuses formes de germes intestinaux. On le vérifie en mélangeant des prélèvements de la suspension bactérienne et des extraits d'intestin moyen, obtenus par broyage et centrifugation de ce segment, le mélange étant laissé pendant vingt heures en « goutte pendante ». Dans ces conditions de nombreux germes résistent à l'attaque enzymatique et d'autres sporulent. Il est certes impossible de déterminer par cette méthode si toutes les bactéries résistent ou si, au contraire, certaines sont digérées. Le problème de la digestion de certaines formes par les enzymes protéolytiques de l'hôte ne pourra être envisagé qu'*in vitro*, lorsque toutes les souches auront été isolées et cultivées.

Quoi qu'il en soit, au cours du cycle digestif, le nombre des germes intestinaux diminue notablement. Sans doute cette diminution numérique est-elle compensée par une multiplication active. Les papilles doivent jouer un rôle dans le maintien de la flore en s'opposant, grâce à l'enchevêtrement de leurs aiguilles chitineuses à l'entraînement total de la flore par le bol alimentaire. Ainsi, lorsqu'on pratique une ponction à travers l'épithélium intestinal, il est facile de provoquer la vidange de l'espace bactérien et en particulier des régions situées entre les papilles; mais l'examen histologique révèle que les micro-organismes associés à chacune des papilles restent en place entre les ornementations chitineuses (pl. 1, fig. 7; pl. 2, fig. 2 et 3). L'hypothèse selon laquelle les papilles représentent des foyers bactériens permanents, est donc tout à fait plausible, sinon démontrée.

D. La flore intestinale au cours du jeûne.

L'évolution de la flore intestinale au cours du jeûne a été étudiée chez des grillons adultes, préalablement nourris de végétaux, puis soumis à une diète hydrique pendant une semaine. Au cours des premières

quarante-huit heures, l'examen histologique montre que l'ensemble du tube digestif est rempli de débris végétaux. Passé ce délai, l'étendue du bol alimentaire se restreint au proctodeum et la membrane péritrophique l'entoure dans l'iléon. A ce niveau aucune structure végétale n'est plus visible, mais dans le côlon et le rectum, les débris végétaux persistent pendant toute la durée de l'expérience. Au bout de huit jours, ces débris stagnent encore dans les segments postérieurs du proctodeum, et ils sont envahis par un nombre considérable de bactéries intestinales. Le contenu de l'iléon, lui aussi, renferme de nombreux germes. Cependant, le volume et la densité de la suspension bactérienne de l'iléon ne diminuent pas (pl. 8, fig. 2).

Par conséquent, le jeûne n'entraîne pas de régression de la flore bactérienne de l'intestin; si certains de ces germes sont digérés au cours du jeûne, comme le fait se produit peut-être au cours du cycle digestif, l'appoint alimentaire doit être faible. Sans doute la rétention alimentaire contribue-t-elle à atténuer les effets du jeûne, en permettant une utilisation très prolongée des aliments ingérés. Leur stagnation dans le proctodeum existe peut-être également au cours du cycle digestif normal, mais ce phénomène qui entraînerait une sorte de « fermentation intestinale », échappe à l'observation.

E. La flore intestinale au cours de la diapause nymphale.

C'est évidemment sur une espèce autre que *Gryllus bimaculatus* qu'il convient de rechercher d'éventuelles modifications de la flore intestinale au cours de la diapause. *Gryllus campestris* est la seule espèce française qui soit favorable à cette étude.

Des larves ont été élevées dans un terrarium contenant un grand volume de terre cultivée, et les nymphes obtenues ont été soumises pendant tout un hiver aux conditions climatiques naturelles de la région parisienne. Les Insectes se sont creusé des terriers dont ils ont été extraits en février et mars pour être examinés. Leur flore intestinale a été étudiée à la fois sur frottis et sur coupes histologiques de tube digestif.

L'intestin postérieur contient toujours des débris végétaux; dans l'iléon, l'espace bactérien est bien développé, la densité microbienne est élevée surtout dans l'enchevêtrement des aiguilles chitineuses des papilles. L'examen des frottis révèle, à côté de formes normales, un très grand nombre de spores (pl. 7, fig. 4).

Les grillons en diapause ne perdent donc pas leur flore intestinale; la présence de débris végétaux dans le proctodeum laisse supposer que les processus digestifs ne sont pas totalement supprimés. Cependant, les bactéries qui en ont la possibilité (*Bacillus megaterium*, *Bacillus thermocellulolyticum*) sporulent dans leur habitat naturel, l'iléon. Ce phénomène de sporulation ne se produit dans l'iléon qu'à ce seul moment de la vie de l'Insecte.

F. La flore intestinale au cours de la mue.

La localisation d'une flore bactérienne extra-cellulaire dans un segment proctodéal pose évidemment le problème de la destinée des

germes au cours des mues, car on sait que très généralement la chitine qui recouvre l'épithélium du proctodeum est expulsée à cette occasion. Il faut donc envisager, pour l'hôte, une réinfestation dans tous les cas où la flore est située dans la lumière proctodéale. Cette question a été étudiée depuis longtemps chez les Termites (Grassi & Foa, 1911; Duboscq & Grassé, 1927; Andrew, 1930; Duboscq & Grassé, 1934), où plusieurs processus assurant la réinfestation ont été reconnus (Grassé & Noirot, 1945). Mais chez les Grillons, nous ne possédons pas de données sur les caractères de la mue dans les voies digestives : il fallait donc les définir pour pouvoir préciser la destinée de la flore intestinale.

J'ai examiné, sur coupes histologiques, les aspects successifs de l'épithélium intestinal au cours de la mue imaginale (fig. 7); la localisation des bactéries a été déterminée après coloration à la fuchsine basique employée dans les conditions techniques du trichrome de Cajal. Les

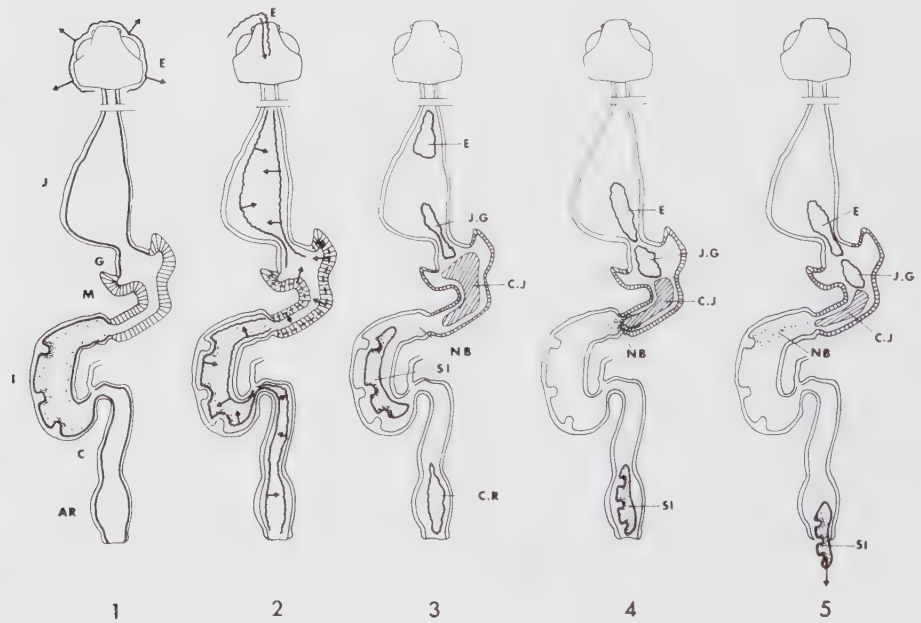


Fig. 7, Chronologie du déroulement de la mue dans les voies digestives de *Gryllus bimaculatus* (1 à 5, phases successives) :

J : jabot; G : gésier; M : mésentéron (segment lisse); I : iléon (segment à villosités); C : côlon; R : rectum; E : exuvie de l'épithélium de recouvrement du corps; J. G. : exuvie de l'épithélium du jabot et du gésier; C. J. : corps jaune; N. B. : nappes bactériennes « libres » dans la lumière; S. I. : sac intimal; C.R. : exuvie du côlon et du rectum.

Les flèches indiquent les décollements de l'intima ou les mouvements de certains éléments (ingestion en 2, expulsion en 5). Les bactéries sont figurées en pointillé.

phénomènes de mue commencent, à l'intérieur du tractus digestif, après le rejet de l'exuvie hypodermique, et se poursuivent pendant quelques heures. Dix minutes environ après l'exuviation, le Grillon complètement dépigmenté commence à dévorer son exuvie; l'ingestion peut durer une heure. Lorsque la pigmentation de l'Insecte est réapparue, l'épithélium intestinal est le siège de modifications morphologiques, qui débutent au niveau du proctodeum et du mésentéron. Dans le côlon et le rectum, l'intima chitineuse se décolle et se ramasse au centre de la lumière, autour d'éléments de structure confuse, riches en acide urique, et qui doivent représenter un mélange de débris alimentaires et de produits d'excrétion. Dans le segment à villosités, le décollement de l'intima, qui est simultané pour les papilles et pour les régions qui en sont dépourvues, refoule presque toute la suspension bactérienne au centre de la lumière intestinale. L'amas bactérien prend alors la forme d'un volumineux cordon, le « sac intimal », bien limité extérieurement par l'exuvie de l'iléon; on y distingue nettement les anciennes papilles, réduites à leur intima munie de ses longues aiguilles si particulières. La mue est ainsi comparable au rejet d'un doigt de gant très épineux, au niveau de chaque papille (pl. 5, fig. 1). La papille qui a expulsé sa cuticule apparaît totalement dépourvue de germes; ses nouvelles aiguilles sont toutes accolées les unes aux autres (pl. 5, fig. 2). Mais les processus mécaniques de l'exuviation, dans l'iléon, n'ont pas pour résultat un *emprisonnement total* de la suspension bactérienne par l'ancienne intima. A la partie antérieure de l'iléon, au contact de la valvule proctodéale, quelques nappes bactériennes, de faible étendue, s'isolent et restent libres dans la cavité intestinale, au contact de la valvule (pl. 5, fig. 6). Leur destinée sera différente de celle des autres bactéries intestinales. Quant aux cellules épithéliales du mésentéron, elles prennent un aspect globuleux; une mince lame, matérialisant en quelque sorte un plan de clivage, se forme entre elles et les nids de cellules de régénération sous-jacents, en même temps que des hémocytes s'infiltrent entre ces derniers (pl. 5, fig. 7 et 8). Suit une desquamation massive des cellules épithéliales. Par ce mécanisme, les parasites, grégarines par exemple, qui infestent la lumière du mésentéron, se trouvent détachés de l'épithélium (pl. 5, fig. 9) et emprisonnés dans la masse des cellules délaminées. Ultérieurement, le sac intimal qui s'est constitué dans l'iléon, progresse vers les régions plus postérieures du proctodeum, pour atteindre l'ampoule rectale sans changer d'aspect (pl. 5, fig. 3) : les papilles, notamment, sont encore parfaitement visibles (pl. 5, fig. 4). Simultanément, la desquamation des cellules épithéliales du mésentéron se poursuit, et un volumineux bouchon se constitue (pl. 5, fig. 10), comme dans le mésentéron des termites. Dans les deux cas, des pigments jaunes apparaissent, d'où le terme de « corps jaune » qui sera également appliqué aux grillons. Les pigments, du groupe des mélamines, ont pour origine la partie apicale dégénérée des cellules desquamées(pl. 6, fig. 3 et 4). Ils forment une enveloppe qui sépare ces cellules du contenu intestinal qu'elles emprisonnent. Dans le corps jaune, les noyaux deviennent rapidement pycnotiques, mais l'activité phosphomono-estérasique alcaline,

caractéristique des cellules du mésentéron, persiste assez longtemps (*). C'est seulement au moment où le sac intimal atteint le rectum que commence le décollement de l'intima du stomodeum. Lorsque le sac intimal est rejeté par l'orifice anal (20 h après l'exuviation, chez *G. posticus*) (pl. 5, fig. 5), l'exuvie hypodermique ingérée se trouve dans le jabot. Celle qui provient du stomodeum pénètre dans la lumière du mésentéron, repoussant le corps jaune dans la partie postérieure du ventricule. Alors les nappes bactériennes qui, par suite de leur situation trop antérieure dans le segment à villosités, n'avaient pas été enveloppées dans le sac intimal, s'accolent à la périphérie du corps jaune (pl. 6, fig. 2). D'autres éléments bactériens se placent à la surface de l'ancienne intima du gésier, lorsque celle-ci parvient dans le ventricule. On assiste donc, à ce stade, à une invasion du mésentéron par les quelques éléments bactériens qui ont persisté dans la lumière intestinale. Après le rejet du sac intimal, ces petits foyers bactériens, poussés en même temps que le corps jaune vers les segments vides du proctodeum, envahissent la lumière de l'iléon dont ils peuvent alors coloniser la paroi vierge.

En résumé, le sac intimal contenant la flore intestinale est donc rejeté par l'orifice anal au cours de la mue. Il entraîne l'exuvie de toutes les papilles, ainsi que les nappes microbiennes situées entre celles-ci, si bien qu'au premier abord l'expulsion des bactéries paraît totale et, par suite, une réingurgitation semble nécessaire. Pourtant je n'ai jamais pu observer de grillon dévorant ses excréta à ce stade de la mue. Certes, l'exuvie hypodermique est dévorée par l'Insecte, mais je n'ai jamais pu mettre en évidence, dans les débris de cette exuvie ingérée et parvenue dans le jabot, des foyers bactériens importants. Des faits tirés de l'observation de grillons placés dans des conditions particulières, confirment que l'infestation n'a pas lieu par voie buccale : chez l'Insecte séparé de son exuvie hypodermique et des excréta rejetés après la mue, maintenu au jeûne absolu, puis soumis à un examen histologique, la flore bactérienne est entièrement reconstituée dans le segment à villosités 48 à 72 h après l'exuviation. La reconstitution est donc réalisée en l'absence de toute ingestion.

C'est dans les petits foyers bactériens qui persistent dans la région de la valvule proctodéale qu'il faut rechercher les seuls éléments assurant la reconstitution de la flore. Par suite de l'absence d'enzymes digestives dans la lumière du mésentéron au moment des mues, ils peuvent pénétrer dans la partie postérieure du mésentéron, s'accoler au corps jaune, puis regagner l'iléon après le rejet de sa cuticule. La multiplication doit alors s'y dérouler avec une grande rapidité, puisqu'en 2 à 3 jours, l'aspect de la flore est redevenu normal. Le mécanisme qui assure la persistance des

(*) Les modifications histologiques préparant le renouvellement de l'épithélium du mésentéron présentent de grandes analogies avec des aspects décrits par Harker (1963) et par Matz (1965), lors des premiers stades de la formation de tumeurs intestinales. Cellules des cryptes de régénération et hémocytes du conjonctif sous-jacent s'organiseraient donc, à l'origine, de la même façon, que leur destinée soit de reconstituer une muqueuse ou de donner naissance à une tumeur.

bactéries dans l'intestin du Grillon, diffère plus ou moins de ceux qui ont été reconnus chez les termites. En premier lieu, il ne semble pas exister dans la transmission des germes, de mécanismes qui soient particuliers aux larves. Les modalités de la mue imaginale peuvent être transposées sans modifications pour la mue qui termine le troisième stade, ou pour celle qui précède et suit le stade protonymphe (pl. 6, fig. 1). Il en est vraisemblablement de même pour les autres mues. Le mécanisme de la mue dans les voies digestives et le comportement des germes à ce moment rappellent les phénomènes qui se déroulent chez *Callotermes flavicollis*, *Zootermopsis angusticollis* (CLEVELAND, 1923), et surtout chez *Cryptotermes lamanianus :* pour ce Termite comme pour le Grillon, une petite partie de la flore persiste dans la lumière intestinale; les processus sont toutefois différents, puisque c'est par passage à travers le sac intimal que certains flagellés du termite se maintiennent dans l'intestin. Il en est de même chez le Dictyoptère *Cryptocercus* (CLEVELAND, 1931; CLEVELAND & *Coll.*, 1934) où les éléments de la flore intestinale perforent le sac intimal. Chez les grillons, ce sac semble constituer une barrière que les bactéries ne peuvent franchir et jamais l'espace qui l'entoure n'est envahi. Le maintien des germes est rendu possible du fait de la fermeture incomplète du sac intimal à son extrémité antérieure. La constitution d'un corps jaune, déjà signalé chez les termites, n'est pas liée à l'existence de bactéries intestinales bien localisées; le renouvellement cellulaire complet de l'épithélium du mésentéron, qui suspend temporairement toute fonction digestive, n'est pas destiné à favoriser de façon spéciale la réinfestation. Une expulsion de matériel cellulaire au moment de la mue, a récemment été décrite dans l'intestin moyen de l'Acridien *Locusta migratoria* (MAMOUD HAFEZ KHAN, 1964); chez cette espèce, j'ai pu observer un corps jaune aussi développé que celui des grillons. Chez les Ensifères *Mogoplistes squamiger*, *Dolichopoda linderi* et *Tettigonia viridissima*, le renouvellement cellulaire du mésentéron est aussi important que chez *Gryllus*. Il semble donc que, chez tous les Orthoptères, l'épithélium de l'intestin moyen soit renouvelé à l'occasion des mues. Mais il existe une différence de chronologie très marquée dans le déroulement des diverses phases de la mue : chez les Orthoptères autres que les *Grylloidea*, la formation du corps jaune et le décollement de l'intima du proctodeum sont contemporains du décollement de la cuticule hypodermique; chez les *Grylloidea* (*Mogoplistes*, *Gryllus*), les processus de la mue dans les voies digestives sont beaucoup plus tardifs. Peut-être ce décalage est-il en relation avec le mécanisme de la réinfestation.

CONCLUSION.

Des micro-organismes colonisent l'iléon des grillons dès le début de la vie larvaire et s'y maintiennent pendant toute la vie de l'Insecte. Leur densité de population ne s'effondre qu'au moment des mues où la quasi-totalité des germes se trouve éliminée. Quelques bactéries sont

rejetées avec les excréta, d'autres peuvent être digérées dans le mésentéron mais elles représentent une perte négligeable vis-à-vis de l'ensemble de la flore. D'autre part, à chaque stade larvaire, le renouvellement de la population s'effectue aux dépens de germes restés en place dans le tube digestif. Il existe donc une stabilité remarquable, à la fois numérique et spécifique, des micro-organismes intestinaux. Une telle constatation conduit à supposer que cette flore permanente n'est pas sans jouer un certain rôle dans la vie de l'hôte. Il convenait donc de rechercher les perturbations biologiques provoquées éventuellement par la défaunation.

Légendes de la planche

PLANCHE V

La mue au niveau du segment lisse et du segment à villosités, chez *Gryllus bimaculatus*.

Fig. 1, Segment à villosités. Décollement de l'intima d'une papille (Fuchsine paraldéhyde-hémalun-jaune de Mars, 100 diamètres). Remarquer l'espace vide (flèche) qui se forme entre les cellules épithéliales de la papille et l'intima. Dans la suspension bactérienne, nombreux grains de chromolipoïdes colorés par la fuchsine paraldéhyde.

Fig. 2, Même stade que précédemment, détail de l'apex d'une papille en cours de mue (Trichrome de R. y Cajal, 400 diamètres). Les cellules épithéliales de l'extrémité de la papille sont en haut et à droite du cliché. Entre l'ancienne intima décollée et dont on voit, en clair, les aiguilles chitineuses parmi les bactéries (en noir), un espace (E) contient les aiguilles agglomérées et encore dépourvues de germes, de la nouvelle intima.

Fig. 3, Fragment du sac intimal parvenu dans l'ampoule rectale (Trichrome de R. y Cajal, 70 diamètres). On distingue nettement l'intima plissée (flèche) et la flore bactérienne de 3 papilles.

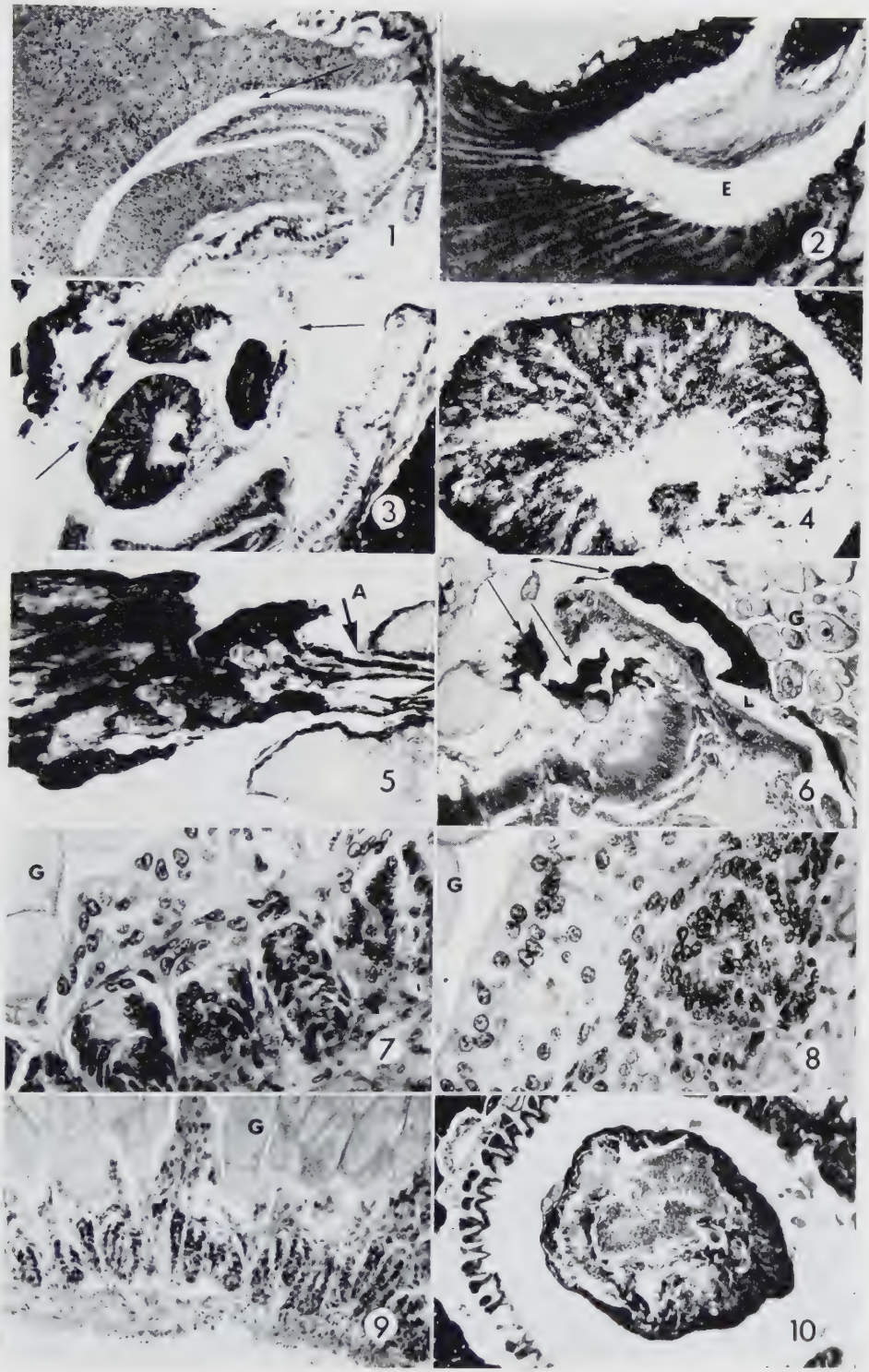
Fig. 4, Détail du cliché précédent (200 diamètres). Ancienne intima correspondant à une papille, et ayant entraîné dans le rectum sa flore associée.

Fig. 5, Rejet du sac intimal, contenant les bactéries (en noir) par l'orifice anal (A). (Trichrome de R. y Cajal, 50 diamètres).

Fig. 6, Détail de la région de la valvule proctodéale au cours de la mue. (Trichrome de R. y Cajal, 100 diamètres). Au centre, le pli épithélial marquant le début de l'iléon; à gauche, le segment lisse (mésentéron), à droite l'iléon. Des grégarines (G) sont déjà passées dans l'iléon. Des nappes bactériennes (flèches) n'ayant pas été incorporées dans le sac intimal, persistent dans la lumière; certaines, à gauche, passent dans le mésentéron.

Fig. 7, 8 et 9, Desquamation de l'épithélium du mésentéron (Feulgen-picro-indigocarmin, 500 et 180 diamètres). Dans la lumière, de nombreuses grégarines (G). Remarquer, sur 7 et 6, les cellules qui forment une sorte de plan de clivage entre les nids de régénération et l'ancien épithélium. Sur le cliché 9, on voitg que la desquamation est simultanée tout au long de la paroi intestinale.

Fig. 10, Corps jaune dans la lumière du mésentéron (Acide periodique-Schiff-hémalun-picro-indigocarmin, 50 diamètres).


1
E
2
3
4
A
5
G
L
6
G
7
G
8
G
9
10

II. — Défaunation partielle ou totale de l'hôte Biologie des grillons aseptiques et pseudo-aseptiques

Deux méthodes permettent de réaliser la suppression d'une flore intestinale extracellulaire : le traitement de l'hôte par les antibiotiques, ou la mise en élevage aseptique d'œufs désinfectés (*).

A. Action des antibiotiques sur la flore intestinale de Gryllus bimaculatus.

Les antibiotiques ont été quelquefois utilisés pour éliminer les bactéries associées aux Insectes, notamment chez les Dictyoptères. Par incorporation d'auréomycine aux aliments, Henry & Block (1960-1961) ont pu obtenir des blattes aseptiques, aposymbiotiques ou encore

(*) J'appellerai « xéniques » les grillons n'ayant subi aucun traitement, « aseptiques » ceux dont la flore intestinale a été éliminée. Par suite de l'absence de micro-organismes intracellulaires chez les Orthoptères *sensu stricto*, il ne peut être question d'obtenir l'équivalent des blattes « aposymbiotiques » pourvues de leurs seuls symbiotes intracellulaires (Brooks & Richards, 1955), les grillons « aseptiques » sont nécessairement « axéniques », c'est-à-dire dépourvus de tout micro-organisme associé.

Légendes de la planche

PLANCHE VI

Fig. 1, Mue proto-deutonymphale. Corps jaune (CJ) sur le point de pénétrer dans le segment à villosités (SV) (Feulgen-picro-indigocarmin, 50 diamètres).

Fig. 2, Détail du corps jaune (Trichrome de R. y Cajal, 350 diamètres). Au centre, masse des cellules épithéliales desquamées; à la périphérie, nappe bactérienne (en gris foncé).

Fig. 3, Apparition des mélanines au cours de la formation du corps jaune (Hexaméthylène-tétramine d'argent-bleu de toluidine, 80 diamètres). Les mélanines, en noir, sont au contact des grégarines situées au centre du corps jaune; les cellules desquamées sont à l'extérieur des mélanines (flèche).

Fig. 4, Détail du cliché précédent. On voit que les mélanines apparaissent à la partie apicale des cellules desquamées (CD).

Fig. 5, Nappe bactérienne parmi les végétaux de la lumière du mésentéron, chez *Tettigonia viridissima* (Trichrome de R. y Cajal, 130 diamètres).

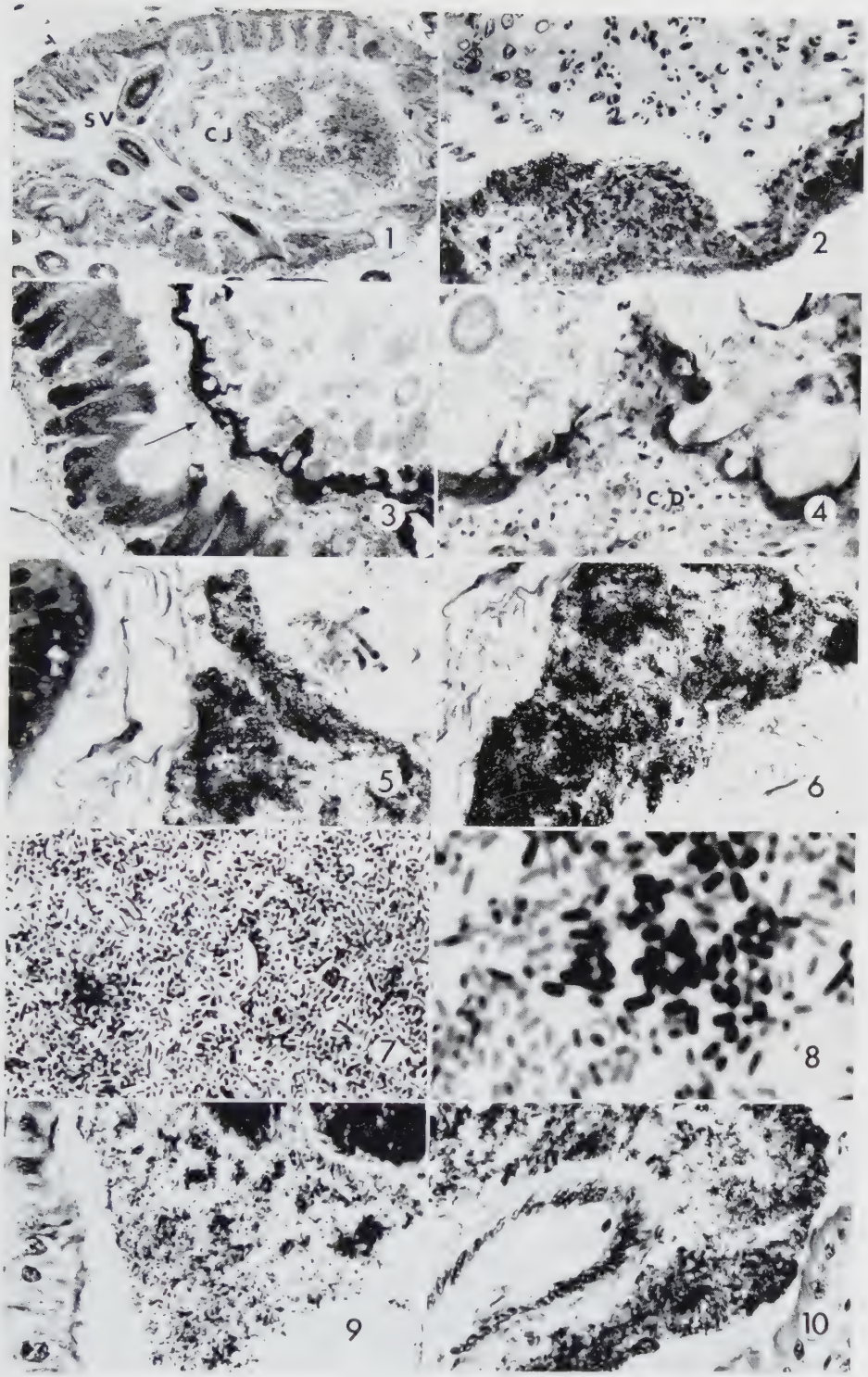
Fig. 6, Détail du cliché précédent. Remarquer le grand nombre des bactéries (250 diamètres).

Fig. 7, Aspect de la flore bactérienne de l'iléon de *Gryllus bimaculatus* sur frottis (Bleu de méthylène, 500 diamètres).

Fig. 8, Même matériel (coloration de Gram, 2000 diamètres). Bactéries Gram + au centre de formes Gram −.

Fig. 9, Flore bactérienne de l'iléon d'un *Gryllus* traité à l'auréomycine (Trichrome de R. y Cajal, 350 diamètres).

Fig. 10, Flore bactérienne dans une papille d'un *Gryllus* traité à la tétracycline (Trichrome de R. y. Cajal, 350 diamètres). Comparer ces deux clichés avec les fig. 2 et 3 de la planche 2.


SV
CJ
1
2
3
CD
4
5
6
7
8
9
10

axéniques, selon le mode opératoire. Dans le cas de la flore intestinale, les auteurs signalent une disparition quasi complète des bactéries après 8 jours seulement de traitement.

Les grillons ont été soumis à l'action de divers antibiotiques incorporés à la nourriture. Pour certains individus, le traitement a été administré pendant la semaine qui précède et la semaine qui suit la mue imaginale. Pour d'autres, il a été prolongé pendant toute la durée de la vie larvaire. Dans tous les cas, une période de mue a été comprise dans la durée de ce traitement en raison du renouvellement de la flore qui s'effectue au moment de l'exuviation. Les résultats ont été soumis à deux sortes de contrôles. D'une part, les germes ont été recherchés sur des frottis provenant de ponctions d'iléons d'animaux traités et d'autre part, le volume de l'espace bactérien et la densité des germes ont été appréciés sur coupes histologiques.

Les résultats obtenus selon ces deux protocoles sont différents et ce sont les traitements prolongés qui ont provoqué la diminution la plus importante de la flore. Il ne sera donc fait état que des données relatives à des grillons traités pendant toute leur vie larvaire.

Les antibiotiques suivants ont été utilisés :

Tifomycine (chloramphénicol)
Auréomycine
Tétracycline
Terramycine
Erythromycine
Oléandomycine

Toutes ces substances, présentées sous forme de poudre orale aromatisée, ont été incorporées à de la nourriture sèche (farine ou broyats de biscuits M 25) et renouvelés tous les 2 jours.

1. Action de la tifomycine

A l'examen histologique, l'espace à bactéries apparaît aussi développé que chez les grillons xéniques. La densité des germes est aussi élevée, tant au niveau des papilles qu'entre celles-ci. Sur frottis, les germes sont extrêmement nombreux et très divers (cocci, bâtonnets, formes bipolaires, etc.) (pl. 7, fig. 2).

2. Action de l'auréomycine

L'espace à bactéries est bien développé, la concentration bactérienne très élevée, au point que les germes sont difficilement individualisés sur les coupes histologiques (pl. 6, fig. 9). La flore est très variée (cocciformes, très nombreux staphylocoques, bâtonnets ou filaments, formes bipolaires).

3. Action de la tétracycline

L'espace bactérien est plus réduit qu'après action des antibiotiques précédents, et la concentration des micro-organismes est nettement plus faible : la suspension bactérienne est beaucoup moins fuchsinophile que

chez les Insectes xéniques, et les germes, du fait qu'ils sont plus clairsemés, sont visibles individuellement. Dans certains cas, ils ne sont abondants qu'au niveau des papilles (pl. 6, fig. 10), et c'est dans cette région qu'il existe parfois un grand nombre de formes nucléées qui apparaissent beaucoup mieux que chez les formes xéniques (pl. 7, fig. 7). L'examen des frottis confirme la forte réduction du nombre des germes; il s'agit essentiellement de formes bipolaires, auxquelles s'ajoutent quelques filaments ou des chaînettes de bâtonnets et des cocciformes (pl. 7, fig. 3).

4. Action de la terramycine

Comme pour la tétracycline, l'espace à bactéries n'est pas considérablement réduit, mais c'est la densité des germes qui diminue. Suivant les individus, c'est tantôt entre les papilles que les germes sont les plus nombreux, tantôt au niveau de celles-ci, l'espace compris entre les papilles ayant alors l'aspect d'une sorte de coagulum peu chromophile dans lequel les germes sont très clairsemés. Sur frottis, la flore comprend les mêmes éléments qu'après traitement par la tétracycline (pl. 7, fig. 1).

La terramycine est le seul antibiotique dont l'ingestion entraîne souvent l'apparition de volumineux cristaux dans la suspension bactérienne (pl. 7, fig. 5 et 6). Ces cristaux sont bien visibles sur frottis; mais sur coupes, en raison de leur solubilité dans les fixateurs, ils apparaissent sous forme d'images négatives. Beaucoup sont disposés en couronne autour des papilles. Par suite de leurs grandes dimensions et de leur nombre élevé, ils provoquent la condensation des micro-organismes dans les régions de l'iléon qu'ils laissent libres. Ces cristaux représentent probablement la forme cristallisée de l'antibiotique.

5. Action de l'érythromycine

La réduction de l'espace à bactéries est comparable à celle produite par la terramycine ou la tétracycline. La densité des germes est également réduite. Ce sont surtout des formes bipolaires qui persistent; il existe également quelques cocci et bâtonnets, mais toujours relativement rares.

6. Action de l'oléandomycine

Cet antibiotique provoque à la fois une diminution du volume de l'espace bactérien, et une réduction bien marquée du nombre des germes. Ce sont surtout des streptocoques et des bâtonnets assez courts qui persistent; ils sont mêlés à des spores.

En *résumé*, aucun des antibiotiques utilisés ne produit une disparition de la flore. L'auréomycine, par exemple, qui donne de bons résultats chez les Dictyoptères (Henry & Block, 1961), est l'un des bactériostatiques les moins efficaces à l'égard de la flore intestinale des grillons. Le chloramphénicol (tifomycine) ne possède pas d'action bactériostatique notable; par contre, l'érythromycine ou l'oléandomycine se révèlent les plus intéressants. Il est souhaitable que des antibiogrammes soient

réalisés sur des cultures pures des diverses souches; ils permettront de mieux connaître la sensibilité des divers germes aux antibiotiques. Des quelques essais effectués sur la flore *in situ*, il apparaît que les formes bipolaires (*Cillopasteurella*) résistent à quatre des cinq substances testées, qui réalisent ainsi une sorte de sélection. L'oléandomycine possède un pouvoir bactériostatique différent des autres antibiotiques utilisés. D'une façon générale, pour la plupart des animaux, c'est le groupe terramycine-tétracycline, l'érythromycine et l'oléandomycine qui sont les plus efficaces; mais, compte tenu de la quantité exceptionnelle de germes de l'iléon des grillons, il subsiste, dans les cas les plus favorables de réduction de la flore, un nombre considérable de micro-organismes dispersés dans une sorte de coagulum. Dans les essais effectués à l'aide d'un mélange de trois antibiotiques (terramycine, tétracycline et auréomycine), la réduction n'est encore que partielle; mais des formes, qui échappent à l'examen de la flore normale par suite d'un trop grand entassement des germes, deviennent visibles. Il s'agit d'éléments nucléés de très petite taille, abondante parmi les aiguilles chitineuses des papilles. Certains rappellent des levures, d'autres pourraient être des microsporidies (pl. 7, fig. 8 et 9).

Les grillons traités aux antibiotiques ne peuvent donc être considérés que comme des Insectes « pseudo-aseptiques », ou, si l'on tient compte du fait qu'il n'existe aucun micro-organisme intracellulaire, « pseudo-axéniques ». C'est une restriction importante dont il y a lieu de tenir compte à chaque fois qu'une intervention de la flore bactérienne dans les mécanismes biochimiques est envisagée : les grillons traités par les antibiotiques courants ne constituent que des témoins imparfaits. Contrairement à ce qui a été décrit chez les blattes (Noland, Jerre & Baumann, 1951), la réduction de la flore intestinale ne semble pas provoquer, chez les grillons, un ralentissement ou un arrêt de la croissance; tous les Insectes pseudo-aseptiques que j'ai élevés ont accompli leur développement comme leurs congénères xéniques, même quand le traitement a débuté à l'éclosion. Mais il est vrai que les deux types d'expériences sont difficilement comparables, car les antibiotiques mis en jeu diffèrent dans les deux groupes (sulfamides chez les blattes). Selon Hilchey, Block, Miller & Weed (1955), l'arrêt de croissance pourrait être provoqué par la seule action des sulfamides sur le métabolisme de l'hôte. Les résultats obtenus sur les grillons montrent qu'il n'existe pas de différences très marquées entre les temps de développement des grillons xéniques et des pseudo-aseptiques; il devra être précisé le jour où la croissance des grillons aura fait l'objet de recherches approfondies. L'examen histologique des Insectes traités aux antibiotiques ne révèle aucune particularité à l'exception des modifications de la lumière de l'iléon déjà signalées. Tous les grillons partiellement défaunés ont un comportement sexuel normal et sont féconds. Mais ici encore, il conviendrait de compléter ces données par une étude statistique de la fécondité, en envisageant également une action propre des antibiotiques sur certaines fonctions physiologiques de l'hôte (Daya Bhanu, 1961).

Les méthodes de défaunation par antibiotiques étant assez limitées dans leurs possibilités, d'autres techniques ont été mises en œuvre pour l'obtention d'Insectes véritablement axéniques.

B. Suppression de la flore intestinale par l'élevage en milieu aseptique.

Les bactéries du segment à villosités peuvent avoir deux origines : soit une transmission congénitale, par les cellules sexuelles, soit une contamination par voie buccale, après l'éclosion. Les glandes génitales ♀ des Gryllides ont déjà fait l'objet de travaux histologiques (Büchner, 1901; Murray, 1926; Durand, 1961; Favard-Sereno & Durand, 1963), et aucune mention n'a été faite d'une infestation des cellules germinales par des micro-organismes qui pourraient avoir migré à partir de l'iléon; mes observations histologiques de gonades sont en accord avec les données classiques. Si la contamination se produit après l'éclosion, on peut donc espérer obtenir des grillons aseptiques en maintenant des larves sur un milieu artificiel stérilisé, après désinfection du chorion qui entoure l'embryon.

La réalisation d'un milieu artificiel convenant à la croissance et à la reproduction est facilitée par le caractère omnivore des grillons; jusqu'à ce jour, c'est la caséine qui a été utilisée pour l'élevage, en milieu semi-synthétique non aseptique, de *G. domesticus* (Mc Farlane, Neilson & Ghouri, 1959). Mais la durée relativement longue de la vie larvaire (plus d'un mois) limite beaucoup les chances de succès d'un élevage aseptique, les risques de contamination par des bactéries pénétrant accidentellement dans le milieu, étant beaucoup plus nombreux que dans les cas où une vie larvaire courte abrège la durée de l'élevage (4 jours chez *Drosophila*). Pour remédier à cet inconvénient, il est intéressant d'ajouter les esters méthylique et éthylique de l'acide *p*-hydroxybenzoïque (Nipagine A et M), à raison de quelques ml d'une solution stérile à 0,1 % pour 50 g de milieu d'élevage. Ces esters s'opposent au développement des micro-organismes. La durée des élevages nécessite également que les Insectes puissent disposer d'une quantité suffisante d'eau. L'hydratation trop grande du milieu nutritif provoque une très forte mortalité à l'éclosion : les nouveau-nés se noient en pénétrant, par les interstices ménagés entre les particules alimentaires, dans les couches profondes très riches en eau. Il importe donc que les grillons soient élevés sur un grand excès de milieu nutritif, ce qui assure le maintien d'une hydratation suffisante tout en constituant un sol dont la superficie est relativement sèche. Cette importance égale des conditions physiques et des conditions alimentaires, a déjà été soulignée (voir Hurpin, 1962). Les meilleurs résultats m'ont été donné par les élevages aseptiques réalisés de la façon suivante : un mélange de

25 g de carottes
25 g de salade
25 g de son
25 g d'aliment complet Extralabo M 25 (*)

est broyé en fines particules et additionné de 50 ml d'eau pour les quantités indiquées ci-dessus. Le milieu nutritif est déposé au fond d'erlenmeyers de 500 ml, à raison de 50 g par flacon. Ceux-ci, bouchés par des cotons, sont stérilisés à l'autoclave à 120 °C pendant une heure. Aucune vitamine n'est ajoutée au milieu. Les facteurs de croissance du groupe B sont indispensables aux Insectes, mais il est probable qu'il y a un apport

(*) Milieu artificiel proposé par M. Fosset, Laboratoire de Cytopathologie, directeur C. Vago, Saint-Christol-les-Alès (Gard).

de vitamines comme d'amino-acides par le vitellus de l'œuf, au moins pour quelques Insectes (Gordon, 1959). J'ai admis qu'il pouvait en être ainsi chez les grillons, et les résultats obtenus, en l'absence de vitamines, ne m'ont pas incité à les introduire dans le milieu stérilisé. Quant au son, qui ne constitue pas un aliment très apprécié, son importance réside dans le maintien de l'hydratation. Les œufs sont déposés sur le milieu quelques heures avant l'éclosion présumée. Débarrassés individuellement des grains de sable, ils sont lavés pendant 5 mn par l'eau de Javel 4 %, puis 10 mn par le formol à 10 %. Les germes qui souillent le chorion sont alors détruits et il est facile de s'en assurer en recherchant des micro-organismes par culture sur gélose des œufs ainsi lavés. Le lavage est suivi de plusieurs rinçages à l'eau distillée stérile, puis des lots d'une dizaine d'œufs sont placés, soit dans 5 ml d'eau stérile, soit dans 5 ml de nipagine stérile. Chaque lot est vidé dans un erlenmeyer contenant le milieu d'élevage. Cette méthode permet d'introduire en même temps les œufs et la nipagine. Après bouchage, les erlenmeyers sont déposés dans une enceinte close, éclairée artificiellement le jour, et dont l'atmosphère est traitée par les rayons ultraviolets. Quand les nécessités de l'expérimentation exigent le repiquage d'une larve sur un milieu neuf, ou le passage d'un imago dans un flacon contenant un autre imago, les deux flacons sont ouverts dans une flamme, et l'Insecte est rapidement transvasé; le milieu nutritif, qui adhère au fond des récipients, n'est jamais entraîné.

Légendes de la planche

PLANCHE VII

Action d'agents physiques ou chimiques sur la flore bactérienne de l'iléon de *Gryllus bimaculatus*.

Fig. 1, Frottis de suspension bactérienne d'un Grillon traité à la terramycine (Bleu de méthylène) 1.500 diamètres). Remarquer les bactéries bipolaires.

Fig. 2, Frottis de suspension bactérienne d'un Grillon traité à la tifomycine (Bleu de méthylène, 600 diamètres). Remarquer la forte densité bactérienne.

Fig. 3, Frottis de suspension bactérienne d'un Grillon traité à la tétracycline (Bleu de méthylène, 1.500 diamètres). Noter la réduction importante du nombre des germes.

Fig. 4, Frottis de suspension bactérienne de *G. campestris*, au cours de la diapause nymphale. (Bleu de méthylène, 1.500 diamètres). Remarquer l'existence de spores, dont l'une est indiquée par une flèche.

Fig. 5, Cristal dans la suspension bactérienne d'un Grillon traité à la terramycine (contraste de phase, 300 diamètres).

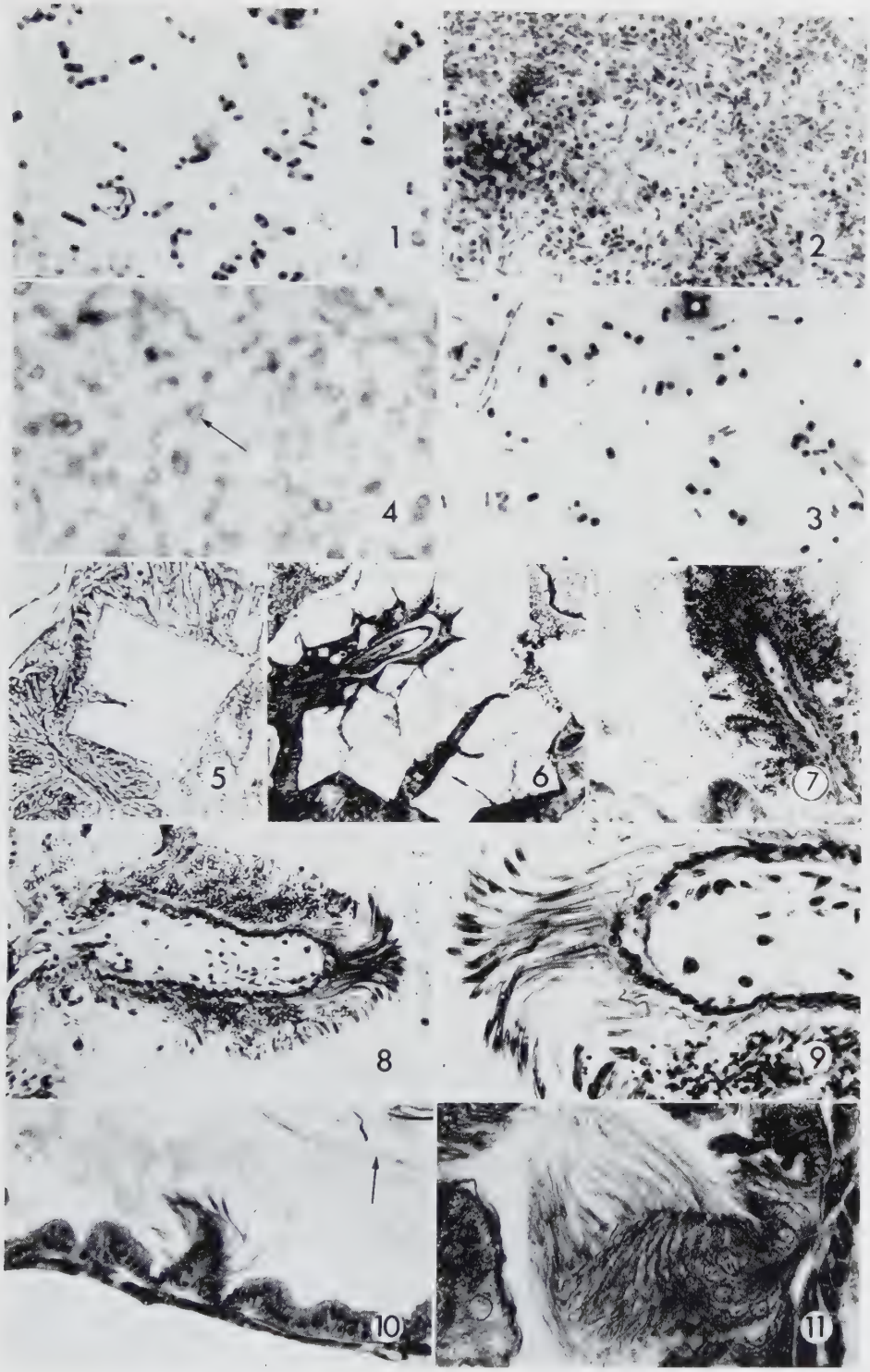
Fig. 6, Même type de traitement de l'hôte. Couronne de cristaux autour de l'axe d'une papille (Trichrome de Prenant, 150 diamètres).

Fig. 7, Région d'une papille chez un Grillon traité par un mélange d'antibiotiques. (Azan, 200 diamètres). Remarquer la faible densité bactérienne dans la suspension située en dehors de la papille; mais la papille est toujours colonisée.

Fig. 8 et 9. Détails du cliché précédent. On voit que la papille abrite des micro-organismes encore nombreux, dont beaucoup sont nucléés. Comparer la densité microbienne avec celle du cliché 6, Pl. 2 (même coloration).

Fig. 10, Fragment de segment à villosités d'un imago aseptique (Trichrome de R. y Cajal, 120 diamètres). Entre la paroi intestinale (en bas) et la membrane péritrophique (flèche) léger coagulum dépourvu de germes (comparer avec fig. 2, Pl. 7). Au centre, une papille.

Fig. 11, Papille dans l'iléon d'un imago aseptique (Trichrome en un temps, 350 diamètres). Remarquer l'absence de germes entre les aiguilles chitineuses.


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11

Dans les élevages réalisés sans nipagine, environ un tiers des flacons se contaminent au cours de l'expérience. Tantôt, ce sont des spores de champignons qui envahissent toute la surface du milieu et les grosses larves s'en nourrissent. Tantôt, ce sont des bactéries qui pénètrent dans les erlenmeyers, et l'odeur du milieu devient nauséabonde, sans que les grillons en paraissent affectés. Dans d'autres flacons, le milieu reste parfaitement stérile et garde son odeur d'origine pendant plusieurs mois. Aucun flacon renfermant de la nipagine ne montre de signes de contamination.

Les élevages sont maintenus à la température de 28-29 °C le jour et 25 °C la nuit. Un très grand nombre de grillons ont atteint le stade imaginal. L'examen de frottis de leur iléon a toujours révélé l'absence de bactéries. Les grillons ainsi traités sont donc aseptiques, et en même temps axéniques. La durée de leur vie larvaire est le plus souvent de 7 semaines; mais il en est qui atteignent la mue imaginale en 40 jours, d'autres pour lesquels la vie larvaire dure plus de deux mois, voire quatre mois. Dans les premières semaines de la vie larvaire, les Insectes vivent en bonne harmonie, mais le cannibalisme apparaît en même temps que les déficits en eau. C'est surtout au cours de la vie nymphale que le nombre des grillons groupés diminue beaucoup, et, le plus souvent, un seul parmi la petite population d'un flacon atteint le stade imaginal. Il n'est pas rare d'observer des nymphes qui creusent un terrier dans le milieu nutritif et qui y séjournent la plus grande partie de la journée. Ce comportement, inhabituel chez *Gryllus bimaculatus*, est peut-être lié à la recherche d'une plus grande humidité dans les couches profondes du substrat.

Légendes de la planche

PLANCHE VIII

Fig. 1, Mésentéron d'un imago aseptique de *G. bimaculatus* (Trichrome de R. y Cajal, 50 diamètres). A la périphérie du bol alimentaire, une sécrétion des cellules épithéliales (flèche) qui s'écoulera dans l'iléon pour y former le coagulum (fig. 10, pl. 6).

Fig. 2, Coupe transversale de l'iléon d'un Grillon, après 8 jours de jeûne (Trichrome de R. y Cajal, 50 diamètres). Au centre, bol alimentaire, dépourvu de débris végétaux. En noir, suspension bactérienne dont la richesse en germes est considérable.

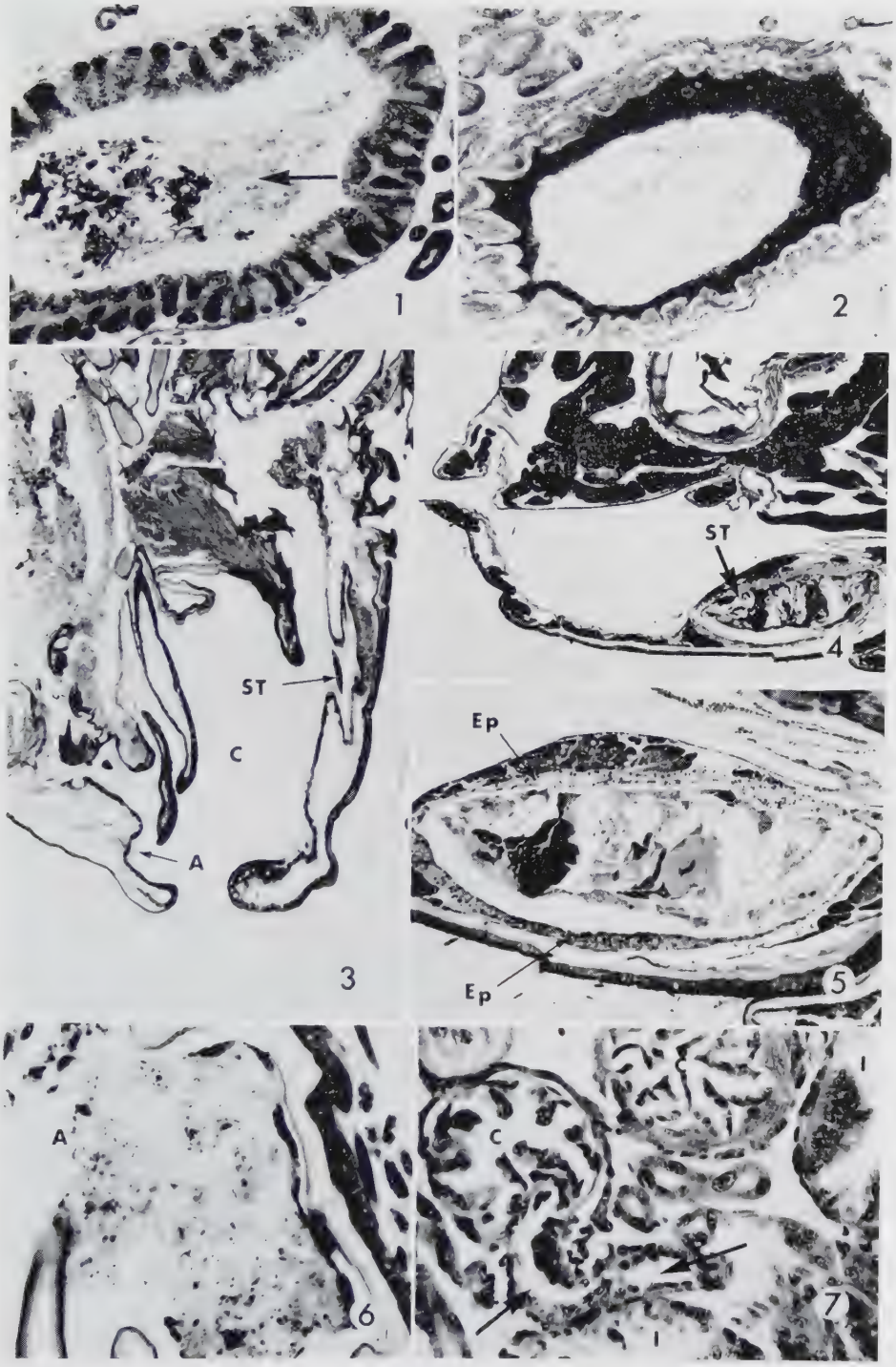
Fig. 3, Coupe parasagittale de la partie postérieure de l'abdomen d'un mâle portant un spermatophore (non conservé sur la coupe) (Trichrome de R. y Cajal, 25 diamètres). C : cavité de rétention du spermatophore. A : anus. ST : niveau des glandes sternales, non intéressées par la coupe.

Fig. 4, Coupe parasagittale d'un imago mâle, passant par une « glande » sternale (ST) (Acide periodique-Schiff-hémalun-orangé G, 30 diamètres).

Fig. 5, Glande sternale d'un mâle (Trichrome de Millot, 70 diamètres). Ep : épithélium bordant la lumière de la glande. Remarquer la variété des produits contenus dans la lumière.

Fig. 6, Emission d'un fluide proctodéal riche en bactéries, au moment de la rétention du spermatophore (Trichrome de R. y Cajal, 250 diamètres (A : orifice anal).

Fig. 7, Naissance de l'uretère, chez un embryon de *Gryllus* à l'éclosion (hémalum-picro-indigocarmin, 330 diamètres). C : sections de côlon; I : sections d'iléon. L'uretère est indiqué par des flèches.


1
2
ST
4
ST
C
A
3
Ep
Ep
5
A
6
C
7

Les imagos aseptiques ont un comportement sexuel qui semble normal. Isolé dans son flacon, le mâle chante; transplanté aseptiquement dans un erlenmeyer contenant une femelle aseptique, il la féconde, et les modalités de l'accouplement sont les mêmes que pour des grillons xéniques. Les femelles aseptiques pondent, et leurs œufs se développent en 10 jours, en donnant des descendants viables.

Ces quelques observations sur le comportement des grillons aseptiques semblent indiquer que le développement et certains actes de leur vie imaginale se déroulent normalement. On sait (Sellier, 1955) que la vie larvaire de *G. bimaculatus* élevé à 30 °C dans une atmosphère à 70 % d'hygrométrie, dure en moyenne 36 jours (*). Le développement des grillons aseptiques est donc, pour la plupart d'entre eux, aussi rapide que celui des grillons normaux, compte tenu de quelques différences dans les conditions d'élevage (température légèrement inférieure, hygrométrie très élevée et variable, renouvellement d'air médiocre). D'ailleurs, des témoins provenant des mêmes pontes que les aseptiques ont toujours eu une vie larvaire de durée comparable. Dans les deux cas, on constate qu'un pourcentage notable d'individus ont une vie larvaire considérablement allongée. Quant au cannibalisme, il n'est pas le propre des Insectes aseptiques; il est provoqué par un déficit d'eau et peut être reproduit à volonté dans les élevages normaux.

A l'exception du segment à villosités, tous les organes ont le même aspect anatomique et histologique chez les grillons xéniques ou aseptiques. Les caractères histochimiques sont également comparables. Quant à l'iléon, sa couleur est beaucoup plus claire que chez les grillons normaux. Il laisse voir, par transparence, la couleur du bol alimentaire. Sur la partie dorsale de sa face convexe, les invaginations correspondant aux papilles n'apparaissent pas. A l'examen histologique, on constate pourtant que ces papilles existent, que leur nombre est élevé et leur situation normale. L'espace bactérien est très réduit, et, en certains points, la membrane péritrophique vient au contact de l'épithélium quand le bol alimentaire est volumineux. Cet espace est vide de tout germe; l'examen de coupes ou de frottis ne révèle qu'un coagulum peu abondant (pl. 7, fig. 10) donnant les réactions des mucopolysaccharides acides et plus faiblement celles des groupements — SH. Ce coagulum représente des sécrétions provenant du segment lisse (ventricule et caeca), qui enveloppent le bol alimentaire (pl. 8, fig. 1) et qui s'écoulent en même temps que lui dans l'iléon. Il ne semble pas correspondre au milieu de culture naturel dans lequel vivent habituellement les germes, car il n'en possède pas les caractères histochimiques. Par suite de l'absence de suspension bactérienne, la plupart des papilles ont un aspect inhabituel qui explique qu'elles soient difficilement visibles à l'examen anatomique : beaucoup sont couchées, et, chez toutes, l'ensemble des aiguilles chitineuses n'a pas la disposition géométrique qui est si remarquable dans l'iléon pourvu de sa flore; les

(*) D'après Fuzeau & Ros (1965), la durée de la vie larvaire de *G. bimaculatus*, élevé en phase solitaire à 28 °C est de 54,2 jours.

aiguilles forment des touffes de disposition très variable et irrégulière (pl. 7, fig. 10 et 11). La hauteur des papilles semble aussi plus faible que chez l'individu normal : 70 à 130 μ dans un iléon défauné, au lieu de 150 à 200 μ dans un iléon normal, la hauteur indiquée ne concernant que la papille supposée dépourvue de ses aiguilles.

En conclusion, la mise en élevage aseptique d'œufs de grillons ayant subi une désinfection extérieure de leur chorion, permet d'obtenir des Insectes rigoureusement aseptiques. Etant donnée l'absence de tout germe intracellulaire chez les Orthoptères, les grillons défaunés peuvent être considérés comme axéniques. Ces résultats sont en accord avec les données histologiques concernant l'absence de bactéries dans l'œuf ou dans l'ovaire des femelles en période de reproduction. Le maintien des nouveau-nés à l'abri de toute infection prévient la constitution de la flore intestinale. Dans la limite de mes observations, il est possible d'affirmer que la suppression de la flore associée, chez les grillons, n'a pas pour conséquences l'apparition de troubles biologiques qui puissent être rapportés à l'absence des germes. A cet égard, les grillons aseptiques diffèrent beaucoup des blattes traitées aux sulfamides, dont la croissance est perturbée (Noland, Jerre & Baumann, 1951). La possibilité de supprimer la flore intestinale en maintenant un œuf désinfecté à l'abri d'une contamination, confirme l'hypothèse d'une infection première par voie buccale. Mais elle pose le problème de la contamination naturelle des nouveau-nés.

III. — L'infestation des nouveau-nés

La contamination des nouveau-nés doit être réalisée *per os*, mais il est difficile de supposer que, dans la nature, l'infestation soit assurée par des contacts entre les jeunes et des individus déjà pourvus de leur flore intestinale (trophallaxie). Ce processus n'est possible que chez les Insectes qui possèdent un minimum d'organisation sociale. On peut l'admettre dans le cas des grillons élevés au laboratoire, où le groupement des Insectes et le transfert, involontaire, des germes par l'expérimentateur, peuvent constituer un mode d'infestation efficace. Mais il en est sans doute tout autrement dans les conditions de vie naturelles; les grillons comptent sans doute parmi les Insectes qui limitent au minimum les relations avec des congénères. Il faut donc rechercher les mécanismes d'une contamination inévitable, puisque tous les grillons qu'on peut récolter sur le terrain sont pourvus d'une abondante flore bactérienne. Il ne sera évidemment possible de conclure de façon définitive que le jour où la nature et l'éthologie des germes intestinaux isolés seront connus. Actuellement, on peut néanmoins envisager deux modes d'infestation.

Des germes non spécifiques, ingérés en même temps que la nourriture végétale, pourraient constituer une première source. Cette hypothèse est vraisemblable dans la mesure où certains des germes qui ont été déterminés chez *G. campestris*, correspondent à des « espèces » qui ont

été également décrites à l'état libre. Un début de vérification est représenté par l'expérience suivante. Des grillons aseptiques, âgés d'un mois, sont remis en contact avec une nourriture normale (feuilles de laitue non lavées, farine, eau), maintenus isolés et fixés une semaine ou quatre semaines plus tard. Au bout d'une semaine, l'espace bactérien est peu développé, la membrane péritrophique est accolée à l'épithélium en de nombreux endroits. Comme chez les grillons aseptiques, beaucoup de papilles sont couchées. Un coagulum peu chromophile remplit l'espace bactérien; en certains points, notamment parmi les aiguilles chitineuses, il existe quelques foyers microbiens, très clairsemés. Au bout d'un mois, l'espace bactérien de l'iléon est plus important, le coagulum abondant, mais les germes sont très peu nombreux. Ils forment des foyers dans les aiguilles des papilles, ou entre celles-ci. Les conditions de temps semblent donc hors de cause : la flore intestinale de l'iléon ne peut se constituer entièrement par le seul apport des microbes ingérés. Mais le fait que des nids bactériens apparaissent chez ces grillons indique que certains éléments de la flore peuvent provenir de formes libres, ingérées en même temps que les végétaux. Ce mode de contamination ne peut pourtant pas expliquer le développement très rapide de la flore intestinale au cours des premiers jours de la vie larvaire. Lorsque des embryons sont isolés dans des tubes à essais, et maintenus chacun dans un tube après l'éclosion, la flore s'établit en quatre jours environ, sans que les Insectes aient échangé de contacts avec des congénères. Dans ce type d'expériences, entre l'individu aseptique rendu à la vie normale, et le nouveau-né simplement isolé avant l'éclosion, un seul facteur diffère, la *présence du chorion*. Il semble donc que ce soit à partir des germes spécifiques qui souillent le chorion de l'œuf, que le jeune grillon reconstitue sa flore. La transmission de germes spécifiques à un grillon aseptique, par contamination de la nourriture à l'aide de la suspension bactérienne prélevée sur un grillon normal, assure la colonisation totale de son iléon en moins d'une semaine : ce sont sans doute ces germes spécifiques qui souillent le chorion. Des frottis de chorion, ou sa mise en culture sur gélose, m'ont toujours révélé l'existence de nombreuses colonies bactériennes. Par les nombreux contacts qu'il entretient avec les restes de son chorion, dans les premiers instants de sa vie, le nouveau-né peut absorber des bactéries.

Il faut évidemment préciser l'origine des bactéries qui contaminent la surface externe de l'œuf. L'examen des voies génitales des imagos permet de comprendre le mécanisme de contamination de l'œuf. Les mâles possèdent deux invaginations paires de la paroi interne du neuvième sternite, considérées jusqu'ici comme des glandes (glandes sternales, Bouthier, 1964). Chacune s'ouvre, par un canal, dans la poche inférieure des *genitalia* (pl. 8, fig. 4). Leur paroi a la même structure que celle d'une spermathèque; leur fonction glandulaire est de peu d'importance quant à la quantité des substances élaborées. Chez les grillons xéniques, elles contiennent, mêlés à la sécrétion qu'elles produisent, des débris alimentaires (cellules végétales, débris de cuticule ingérée), ainsi que des cristaux d'urates, et surtout de nombreuses bactéries (pl. 8, fig. 5). L'association

de ces dernières à des déchets alimentaires ou excrétés indique qu'elles proviennent du tube digestif, et non du milieu extérieur au grillon. D'ailleurs, chez les individus qui ont subi une défaunation importante par les antibiotiques, il n'existe plus de bactéries dans ces glandes, qui ne contiennent plus que des débris alimentaires. Les glandes sternales représentent ainsi des sortes de réservoirs à bactéries; elles se remplissent sans doute à partir de liquide proctodéal qui vient baigner la plaque sous-génitale. Avant son émission, le spermatophore déjà élaboré est retenu dans une vaste cavité prolongeant la poche inférieure des *genitalia*, poche qui résulte de l'évagination des valves génitales; cette cavité est fermée, vers le haut, par les valves anales (pl. 8, fig. 3). Le spermatophore est alors recouvert d'une mince pellicule externe, provenant d'une part de l'extrusion du contenu des glandes sternales, d'autre part d'une goutte de liquide proctodéal émise à ce moment (pl. 8, fig. 6). En effet, l'anus, par suite de la dévagination des valves génitales, débouche alors dans la cavité qui loge le spermatophore. Fluide proctodéal et contenu des glandes sternales contribuent ainsi à contaminer la surface du spermatophore; après l'accouplement, les glandes sternales sont vides. Le reste du processus d'infestation devient hypothèse : on peut imaginer qu'après l'accouplement, la couche bactérienne déposée sur le spermatophore souille les valves génitales de la femelle, ainsi que la chambre périvulvaire située à la base de l'oviscapte, pendant le temps relativement long où le spermatophore reste à demi-inclus dans les voies génitales. Les oviductes sont exempts de germes; l'œuf les traverse sans subir de contamination. Mais au moment de l'oviposition, il serait souillé par les germes déposés sur les parties ectodermiques des voies génitales. De plus, au cours de l'oviposition, la femelle relève fréquemment sa tarière, ce qui entraîne l'émission réflexe d'excréta ou de fluide proctodéal. La disposition anatomique des *genitalia* de la femelle ne permet pas aux micro-organismes ainsi émis de venir souiller directement le chorion des œufs en cours de ponte. Mais la femelle réalise néanmoins la contamination du milieu dans lequel sont déposés les œufs.

En *conclusion*, l'infestation des nouveau-nés est réalisée sans trophallaxie. La flore bactérienne est transmise par la surface externe du chorion de l'œuf, selon un processus assez complexe. Une faible partie des germes peuvent aussi avoir pour origine la nourriture ingérée.

IV. — Sur quelques points de la physiologie des orthoptères, en relation avec la présence de concentrations bactériennes intestinales

A. Introduction et problèmes techniques.

On sait que les micro-organismes intestinaux peuvent intervenir dans certaines synthèses dont l'hôte tire un profit certain. Le fait est connu chez les Mammifères à rumen ou à caecum, chez lesquels ils fermentent les oses, dégradent les sulfates et l'urée. Chez les Insectes, ils

participent à la synthèse de stérols (Clayton, 1960) à la digestion des glucides (Pavlovsky & Sarin, 1922; Fletcher & Naub, 1933; Simmons, 1939) ou à la récupération de certains déchets métaboliques (urée, acide urique; Toth, 1952); jusqu'à une date récente, on les a crus responsables de la dégradation des sulfates et de la cellulose. Leur rôle dans la synthèse des vitamines n'a jamais été clairement démontrée (Kaudewitz, 1953), sauf pour *Nocardia rhodnii*, bactérie de la lumière intestinale de *Rhodnius* (Baines, 1956), alors qu'il est bien connu dans le cas des germes intracellulaires (Fraenkel & Blewett, 1943; Gallacher, 1963).

Les données les plus précises concernant l'intervention des micro-organismes dans le métabolisme de l'Insecte résultent, pour la plupart, de l'application de méthodes utilisant les radio-isotopes. La taille réduite de ces animaux et le faible volume des amas bactériens se prêtent mal, en effet, à la mise en œuvre des méthodes biochimiques traditionnelles. L'étude des relations entre certains aspects de la physiologie des Orthoptères et la présence des bactéries intestinales, que je me suis proposé d'aborder, est également basée sur l'utilisation des isotopes, dont il importe de préciser d'abord les possibilités et les limites.

Ces techniques sont essentiellement biochimiques et histo-autoradiographiques. La méthode histo-autoradiographique, appliquée aux coupes à la paraffine, peut être pratiquée selon deux modes opératoires qui, suivant les conditions de la fixation, ont des répercussions différentes sur la détection des éléments radio-actifs conservés dans les coupes. Après fixation dans un liquide relativement anhydre (Carnoy), le couchage de l'émulsion sur des coupes déparaffinées, mais non hydratées, doit permettre une conservation des composés hydrosolubles. Il n'en est plus de même si l'émulsion photographique est déposée sur des coupes préalablement colorées en milieu aqueux, ou sur d'autres provenant de pièces fixées dans une solution aqueuse (formol salé). Il me paraît essentiel que ces deux points, fixation et moment du couchage de l'émulsion, soient pris en considération avant toute tentative d'interprétation des autoradiographies. D'autre part, ces méthodes ne révélant que des atomes, sans donner d'informations sur la nature chimique des composés qui les contiennent, on doit envisager le problème de la conservation de toutes les substances dans lesquelles les atomes marqués sont susceptibles d'être incorporés. Elles peuvent représenter non seulement un dérivé du précurseur, mais également le précurseur lui-même, s'il s'est maintenu assez longtemps et en concentration suffisante pour impressionner l'émulsion sensible.

J'ai donc cherché à évaluer les pertes que pouvaient subir, du fait des opérations histologiques, les précurseurs utilisés au cours de ces études (sulfate de sodium, urée), ou les amino-acides libres (cystéine, cystine) dont on soupçonne l'apparition dans certaines conditions expérimentales. Je n'ai pas examiné le problème pour les protéines et les mucopolysaccharides, dont les conditions de conservation sont bien connues. L'action très différente des fixateurs aqueux ou alcooliques peut être étudiée par analyse chromatographique des mélanges utilisés pour la fixation des pièces radio-actives. Dans le cas des grillons injectés au radiosulfate, les chromatogrammes réalisés avec le Carnoy ayant servi à la fixation montrent une radioactivité faible au niveau d'ions SO_4; la radio-activité devient très forte pour les chromatogrammes établis à partir du formol salé. Si c'est un amino-acide soufré radio-actif qui a été injecté avant la fixation, les deux fixateurs extraient une quantité suffisante du précurseur pour que leur radio-activité soit importante; il en est de même dans le cas de l'urée radio-active. On peut aussi apprécier le degré de conservation d'un isotope lors de la fixation et des diverses manipulations histologiques, en soumettant à l'analyse chromatographique les divers solvants mis en contact avec les pièces ou les coupes. Ainsi, dans le cas où une pièce préalablement injectée au radiosulfate a été fixée au Carnoy, l'analyse chromatographique de l'eau ayant servi à l'hydratation des coupes

(étalement, coloration) permet de reconnaître une tache radio-active correspondant aux ions sulfate. Le Carnoy avait donc préservé une partie du précurseur injecté.

Dans le but de mieux préciser les conditions de conservation de certains isotopes, j'ai été amené à imaginer une méthode simple de contrôle. Le mode opératoire est le suivant :

— des fragments de 1 cm² de papier Whatman n° 1 sont immergés dans une solution de l'isotope. Les papiers sont séchés et leur radio-activité mesurée au compteur de Geiger-Müller;

— les papiers sont fixés pendant 12 h, soit au Carnoy, soit au formol, puis lavés à l'alcool absolu ou à l'alcool à 95°. De nouveau, les papiers sont séchés et leur radio-activité est mesurée;

— les papiers sont « éclaircis » au benzène, séchés et passés au compteur;

— les papiers sont hydratés suivant la même technique que les coupes histologiques. Ils sont colorés à l'hémalun, lavés et séchés. Leur radioactivité est mesurée.

L'ensemble des résultats est porté dans le tableau suivant :

Isotope	Traitement	Radio-activité (coups par mn)	Radio-activité résiduelle (%)
Sulfate de sodium (^{35}S)	papier non fixé	270 000	
	— fixé Carnoy	260 000	96
	— fixé-éclairci	260 000	96
	— hydraté-coloré	7 000	2,5
	papier non fixé	270 000	
	— fixé formol	7 000	2,5
	— fixé-éclairci	7 000	2,5
	— coloré	4 400	1,6
Chlorhydrate de cystéine (^{35}S)	papier non fixé	56 000	
	— fixé Carnoy	20 000	35
	— fixé-éclairci	20 000	35
	— hydraté-coloré	12 000	20
	papier non fixé	56 000	
	— fixé formol	1 500	3
	— fixé-éclairci	1 500	3
	— coloré	1 000	2
Urée (^{14}C)	papier non fixé	5 000	
	— fixé Carnoy	350	7
	— fixé-éclairci	350	7
	— hydraté-coloré	280	5
	papier non fixé	5 000	
	fixé formol	400	8
	fixé-éclairci	400	8
	— coloré	200	4

Ces informations, sommaires sans doute, sont toutefois en accord avec les données de l'examen chromatographique des fixateurs, et quelques conclusions s'en dégagent. L'urée est mal conservée par les deux types de fixateurs; étant donné la faible activité spécifique de l'isotope utilisé, les 3 ou 4 % de radio-activité qui persistent après coloration des échantillons, ou même les 8 % qui existent après la fixation seule, ont peu de chances d'être décelés dans les conditions normales de la technique histo-autoradiographique, où le temps de pose est limité. Les essais effectués avec le chlorhydrate de cystéine montrent que certains amino-acides soufrés libres sont bien conservés si les pièces sont fixées au Carnoy et si la coloration des coupes est rapide. Par contre, toute la radio-activité disparaît dans les conditions d'hydratation prolongée que représente la fixation au formol. Il en est sans doute de même pour la méthionine, mais non pour la cystine, qui, comme on le sait, est très peu soluble dans

l'eau. Enfin, pour le radiosulfate, les résultats sont assez surprenants par rapport aux données des histochimistes qui l'ont utilisé en vue de localiser les sulfomucopolysaccharides, après fixation au Carnoy. Aucun ne semble avoir pris en considération une éventuelle conservation du précurseur. Or, de grandes différences sont à prévoir selon que l'émulsion photographique est appliquée avant hydratation de la coupe (96 % du sulfate sont encore présents) ou après coloration (2,5 % du sulfate restent seulement). Même dans les cas où les traitements histologiques provoquent une perte de 95 % de la radio-activité, le sulfate restant doit être parfaitement révélable, étant donné la haute activité de l'isotope utilisé.

Par conséquent, l'interprétation des résultats doit être, dans chaque cas, soumise à l'analyse critique des conditions techniques.

B. Quelques aspects du métabolisme du soufre.

On sait que les Dictyoptères (*Blatella*) sont capables de convertir le soufre minéral en soufre organique (Hilchey, Block, Miller & Weed, 1955), et qu'ils peuvent également assurer la transformation de la cystéine en méthionine (Block & Henry, 1961). Il semble que ce soit, non la flore intestinale qui intervienne dans ces processus métaboliques, mais les bactéroïdes du corps gras (Henry & Block, 1960; Block & Henry, 1961). Tous les Orthoptères *sensu stricto* sont dépourvus de tels symbiotes intracellulaires, mais la présence dans le segment à villosités des *Grylloidea*, d'une flore qui fixe intensément le radiosulfate, pose le problème d'une intervention de ces micro-organismes extracellulaires dans le métabolisme du soufre. Il est d'ailleurs démontré que, chez les Mammifères ruminants, c'est la flore intestinale qui intervient dans la réduction des sulfates (Block, Stekol & Loosli, 1951; Henderickx, 1960). L'existence de formes possédant un segment intestinal à bactéries (*Gryllus*, *Gryllotalpa*) et de formes en étant dépourvues (*Locusta*, *Tettigonia*, *Orphania*, *Conocephalus*) désigne les Orthoptères comme un matériel de choix en vue d'une étude comparative d'où se dégagerait le rôle des bactéries. De plus, la possibilité d'obtenir des grillons partiellement ou totalement défaunés, dont la croissance et le comportement restent néanmoins normaux, est précieuse en ce sens qu'elle fournit des témoins valables. Enfin, la facilité avec laquelle la plupart des germes du segment à villosités se prêtent à la mise en culture sur des milieux synthétiques, permet d'envisager l'action bactérienne, *in vitro*, sur divers précurseurs soufrés.

1. Incorporation du soufre minéral

Les Insectes reçoivent une injection unique d'isotope, à raison de 50 µ C de radiosulfate de sodium par g d'animal. D'autres sont nourris à l'aide d'un aliment supplémenté par le même isotope.

La méthode d'extraction et de caractérisation des amino-acides soufrés est inspirée de la technique classique utilisée pour l'étude de la synthèse des amino-acides, chez les Ruminants. J'ai suivi le mode opératoire de Hilchey, Block, Miller & Weed (1955). Les Insectes traités au radiosulfate sont autopsiés entre 24 h et une semaine après avoir reçu l'isotope par injection ou ingestion. Leur tube digestif est retiré. Le reste du corps, ou certains organes particuliers, sont broyés dans l'acétone. Après évaporation, les lipides sont extraits par l'éther éthylique. Le résidu, séche, est hydrolysé pendant 20 h par HCl 3N. L'hydrolysat, filtré et évaporé, est repris par l'eau chaude acidifiée. Le soufre minéral, libre ou provenant de l'hydrolyse des poly-

saccharides soufrés, est éliminé, après addition d'un entraîneur, par Ba Cl_2 à l'ébullition. Après repos et centrifugation, le surnageant, alors dépourvu de soufre minéral, est débarrassé de son excès de baryum et évaporé. Le résidu, repris par l'isopropanol à 10 %, est analysé par chromatographie sur du papier Wathman n° 1. Cette méthode permet la caractérisation des amino-acides totaux. Dans le cas où une recherche des acides aminés libres s'avère nécessaire, ceux-ci sont extraits par broyage des Insectes dans l'alcool à 95° chaud; les amino-acides libres sont recherchés par chromatographie de cette solution alcoolique, préalablement concentrée. Les seuls amino-acides engagés dans les protéines peuvent ensuite être recherchés par hydrolyse des pièces traitées par l'alcool à 95° chaud. Dans tous les cas, j'ai opéré en présence de traces de N-éthylmaléimide, afin d'éviter l'oxydation des amino-acides soufrés.

Les systèmes de solvants utilisés sont les suivants. Ils sont extraits du manuel de chromatographie de Lederer & *coll.* (1959) sauf le second qui est dû à Wellington (1952) :

système 1 (descendant) : *n*-butanol, acide acétique, eau (4 : 1 : 1);
— 2 (descendant) : éthanol, *t*-butanol, ammoniaque 58 %, eau (60 : 20 : 5 : 15);
— 3 (descendant) : *n*-butanol, butanone, eau (10 : 10 : 5);
— 4 (ascendant) : éthanol, *n*-butanol, eau, acide propionique (10 : 10 : 5 : 2);
— 5 (ascendant) : éthanol, *n*-butanol, eau, pipéridine (10 : 10 : 5 : 2);
6 (descendant) : *t*-butanol, acide formique, eau (75 : 10 : 15).

Les chromatogrammes sont mis en contact avec des films d'émulsion Kodirex, pendant une durée allant de quatre jours à trois mois. C'est seulement après que les acides aminés sont révélés par la ninhydrine en solution dans l'acétone; la position des spots radio-actifs est alors comparée à celle des taches obtenues (*). Les composés soufrés étant susceptibles de donner des artefacts (doubles spots), on ne tient compte que des spots dont le Rf est caractéristique pour tous les systèmes de solvants.

La méthode histo-autoradiographique appelle quelques remarques. Depuis les premières recherches concernant la fixation du radiosulfate de sodium dans l'organisme des Mammifères (Shinger & Marinelli, 1945), les lieux d'incorporation ont fait l'objet de nombreux travaux, chez les Vertébrés. Les données histochimiques les plus importantes sont réunies dans la mise au point de Bescol-Liversac (1958). Très généralement, les auteurs ont souligné l'existence de mucopolysaccharides acides au niveau des lieux d'émission radio-active. Les recherches, tant histochimiques (Kawiak, 1963), que biochimiques (Franco-Browder & *coll.*, 1963; Dziewiatkowski, 1951) permettent de penser que les composés qui fixent le radiosulfate sont essentiellement des sulfomucopolysaccharides, même dans les cas où une légère dégradation de l'ion sulfate est possible (Machalin, Pearson & Denton, 1955; Machalin, Denton, Pearson & Bird, 1953; Gothié, 1955; Chapeville & Fromageot, 1956). Chez les Vertébrés, l'injection de sulfate radio-actif semble, ainsi, constituer une méthode assez spécifique de caractérisation des mucopolysaccharides sulfatés, au moins sur coupes à la paraffine où des sulfolipides ne sont pas conservés. Harbers (dans Handbuch der Histochemie, 1958) conclut dans le même sens, en précisant les conditions de

(*) J'utiliserai le terme « radiochromatogramme » pour désigner l'émulsion photographique, révélée, correspondant aux chromatogrammes. Le terme « radio-autographie », utilisé couramment par les biochimistes, me semble pouvoir entraîner des confusions, dans un travail qui fait appel aux isotopes à des fins biochimiques et histochimiques.

mise en évidence des sulfomucopolysaccharides acides. L'application qui est sans doute la plus complète et la plus valable, du radiosulfate à l'étude des mucopolysaccharides, est due à Spicer (1960) et concerne les mucines des Rongeurs. Chez les Insectes, par contre, le radiosulfate n'a pas été employé à des fins histochimiques, mais seulement dans le but d'apporter un complément morphologique à des recherches biochimiques. Henry & Block (1960), l'ayant injecté à des blattes, donnent une liste sommaire des organes qui, après fixation au Carnoy, sont radio-actifs, et ils semblent admettre, *a priori*, que les atomes de soufre provenant du sulfate sont tous incorporés à des protéines. Or, il est bien évident que, chez les Vertébrés comme chez les Insectes, des contrôles auraient été souhaitables pour qu'il soit établi que le métabolisme du soufre présente de telles différences dans les deux groupes zoologiques. J'ai indiqué précédemment que le Carnoy conservait une partie du sulfate injecté. D'autre part, la dégradation des sulfates, chez les Vertébrés de laboratoire, ne peut-elle être suivie d'une incorporation d'atomes de —^{35}S dans les protéines, qui soit suffisante pour être révélée par histo-autoradiographie? Enfin, on ne peut rejeter, *a priori*, l'hypothèse d'une fixation de sulfate par les mucopolysaccharides des Insectes; il est admis que ces composés sont mal représentés dans ce groupe (Day, 1949; Gabe, 1962), mais c'est peut-être faute de les avoir étudiés. L'isotope du soufre ayant été utilisé, ici, pour mettre en évidence certains mécanismes physiologiques, il était nécessaire de pouvoir aller au-delà d'un simple examen histo-autoradiographique, et d'envisager une série de contrôles histochimiques destinés à préciser la nature des composés dans lesquels le soufre est engagé.

Il est d'abord nécessaire d'apprécier la radio-activité imputable au sulfate libre et aux amino-acides soufrés non engagés dans les protéines. D'après les considérations techniques précédentes, il faut comparer des autoradiographies provenant de pièces fixées au Carnoy et de pièces fixées au formol salé, et, dans le premier cas, comparer des coupes recouvertes d'émulsion avant ou après l'hydratation.

Il y a lieu de préciser les caractères histochimiques des tissus ou des sécrétions, sièges d'une émission radio-active, et en particulier de rechercher si les composés radio-actifs donnent les réactions des mucopolysaccharides acides, masqués ou non, ou bien celles des protides sulfhydrilés. Il est évident que, dans ce cas, l'application des méthodes histochimiques ne constitue qu'une première approximation, puisque des mélanges de mucopolysaccharides et de protides sulfhydrylés sont possibles, et que la méthionine échappe complètement à la détection histochimique. Par conséquent, la méthionine radio-active qui impressionne l'émulsion d'une histo-autoradiographie est indécelable par les réactions des protides soufrés.

Il faut comparer les résultats des injections de radiosulfate et de méthionine —^{35}S. Si les lieux radio-actifs sont identiques, le soufre provenant du sulfate est probablement incorporé à des protides soufrés, sauf dans le cas où il y aurait un mélange de ces protides avec des mucopolysaccharides soufrés.

Il est essentiel de pouvoir éliminer, de façon sélective, le soufre minéral avant le couchage de l'émulsion sur les coupes. Si un tel procédé est applicable, la seule radio-activité conservée peut être rapportée aux protides soufrés. La comparaison d'autoradiographies normales et de celles où les ions SO_4 auraient ainsi été éliminés, devrait permettre de préciser si la radio-activité est due à des mucopolysaccharides (soufre minéral), à des protides (soufre organique) ou à un mélange des deux. C'est par la réaction de méthylation que l'élimination sélective du soufre minéral a été

tentée. On sait, en effet, que le traitement des sulfomucopolysaccharides par l'alcool méthylique acidifié élimine les groupements sulfatés (KANTOR & SCHUBERT, 1957); l'acide méthylsulfurique qui se forme est soluble dans le bain de méthylation, et disparaît donc des coupes :

$$R\text{-}SO_3H + CH_3\text{-}OH \xrightarrow{HCl} R\text{-}OH + SO_3\ (CH_3\text{-}O)\ H$$

Les conditions techniques de la désulfatation ont été précisées par SPICER (1960), qui reconnut la nécessité d'une température élevée (60 °C) prolongée pendant 3 à 4 h, au moins chez les Rongeurs.

Il n'est pas exclu que ce procédé puisse agir sur la radio-activité des protides soufrés, dont une hydrolyse partielle peut être réalisée par l'acide chlorhydrique du mélange de méthylation. L'alcool méthylique acide pourrait aussi extraire la cystine libre conservée lors des fixations aqueuses; ce fait est facile à vérifier par l'étude de la solubilité de cet amino-acide dans le mélange de méthylation. Quant à l'hydrolyse des protides, elle est facile à rechercher par radiochromatographie de l'alcool méthylique acide dans lequel a séjourné, pendant une dizaine d'heures à 60 °C, un grillon radio-actif injecté à la méthionine—^{35}S et fixé. On constate que, malgré le temps relativement long de la méthylation, l'hydrolyse est peu importante. A l'échelle histo-autoradiographique, elle est également peu perceptible sur des coupes de grillons injectés à la méthionine—^{35}S et méthylées. Ainsi, dans la mesure où l'on ne cherche pas à conserver les acides aminés libres, la méthode de la méthylation à 60 °C, pratiquée avant le couchage de l'émulsion, m'a semblé pouvoir apporter quelque lumière dans le difficile problème de la distinction histologique entre soufre organique et soufre minéral. La méthylation doit permettre la mise en évidence sélective du soufre des amino-acides, au moins quand ceux-ci sont engagés dans des liaisons protidiques.

a) Espèces à segment bactérien.

α) *Gryllidae* (*Gryllus bimaculatus*).

Par chromatographie, les amino-acides soufrés radio-actifs ont été recherchés sur des lots de cinq animaux, dans les organes suivants : d'une part, les glandes annexes de l'appareil génital mâle, qui sont le siège d'une importante fixation de soufre; d'autre part, un mélange de tous les autres organes, à l'exclusion du tube digestif qui est prélevé pour l'étude histo-autoradiographique; j'appellerai « reste du corps » ce mélange d'organes. Les autopsies ont lieu de deux à sept jours après l'injection ou l'ingestion de l'isotope.

L'examen des chromatogrammes montre alors l'existence de plusieurs acides aminés radio-actifs. Les Rf des spots sont les suivants :

Systèmes de solvants	Glandes annexes mâles	Reste du corps (sauf tube digestif)
1	0,04; 0,06; *0,13*; **0,52**	traînée; **0,50**
2	0,22; *0,56*; **0,85**	0,30; 0,38; 0,44; *0,56*; **0,80**
3	*0*; **0,22**; 0,50	
4	**0**; *0,14*; **0,52**	*0,12*; traînée; **0,46**
5	*0,20*; **0,60**	traînée; *0,22*; **0,60**
6	0,06; 0,35; 0,58; **0,78**	*0,20*; 0,40; 0,60; **0,80**

Le terme « traînée » correspond à des taches trop allongées pour qu'il soit possible de calculer avec précision leur position. Les Rf inscrits en *italique* peuvent être rapportés à la cystine, ceux qui sont portés en **caractères gras** à la méthionine. Les autres taches n'ont pu être attribuées à des composés identifiables; peut-être la tache de Rf 0,30 dans le système 6 représente-t-elle la cystéine. Quoi qu'il en soit, les composés dont la radio-activité est la plus intense correspondent toujours à la méthionine et à la cystine, le premier de ces deux amino-acides étant toujours plus abondant que le second. Les autres substances non identifiées ne se trouvent jamais en quantité importante, si l'on en juge par le faible rayonnement qu'elles émettent. Par la recherche de la radio-activité des extraits alcooliques, j'ai pu mettre en évidence une activité assez faible sur la méthionine libre, une activité plus intense sur deux spots qui pourraient correspondre à la cystéine et à la méthionine-sulfoxyde (Rf 0,06 et 0,12 dans le système 1). Mais les deux spots les plus intensément radio-actifs, dans les extraits alcooliques, correspondent à des composés ne donnant pas de réactions positive à la ninhydrine. Il s'agit, en premier lieu, d'ions sulfates libres, en second lieu d'un composé inconnu, qui correspond exactement à celui décelé dans les extraits alcooliques des blattes nourries au radiosulfate (« unknown 1 », Henry & Block, 1960). Les ions sulfate sont abondants, surtout dans les glandes annexes mâles, quel que soit le délai écoulé entre l'injection et l'analyse, pourvu que les grillons mâles ayant reçu l'isotope soient isolés des femelles. Ceci est d'ailleurs la condition essentielle pour que la radio-activité des glandes annexes mâles, quelle que soit la forme chimique dans laquelle se trouve engagé le soufre, soit importante. En effet, en isolant les Insectes, on interrompt le rythme des sécrétions des glandes en relation avec la production cyclique des spermatophores, et, en fait, la mesure de la radio-activité des spermatophores émis chaque jour, montre que celle-ci diminue progressivement dans la semaine qui suit l'injection (fig. 8). Si l'on n'isolait pas les mâles, les analyses porteraient alors sur des glandes ayant déjà émis la plus grande partie de leurs sécrétions radio-actives.

En conclusion, l'injection, ou l'ingestion, de radiosulfate de sodium à des grillons est suivie d'une conversion d'une partie des ions minéraux en soufre organique incorporé à des acides aminés et à des composés inconnus. Même en l'absence de recherches quantitatives, on peut affirmer que ce processus métabolique conduit à la formation de quantités importantes de composés organiques soufrés, étant donné les temps d'exposition relativement courts nécessaires à l'impression de l'émulsion mise au contact des chromatogrammes. Les résultats sont identiques, que l'Insecte ingère l'isotope ou que celui-ci lui soit administré par injection.

En ce qui concerne les résultats histo-autoradiographiques, j'envisagerai successivement quelques organes parmi ceux qui incorporent le plus intensément le soufre provenant du radiosulfate.

La recherche des mucopolysaccharides acides non masqués, chez les grillons, ne donne de résultats positifs que dans un petit nombre de tissus.

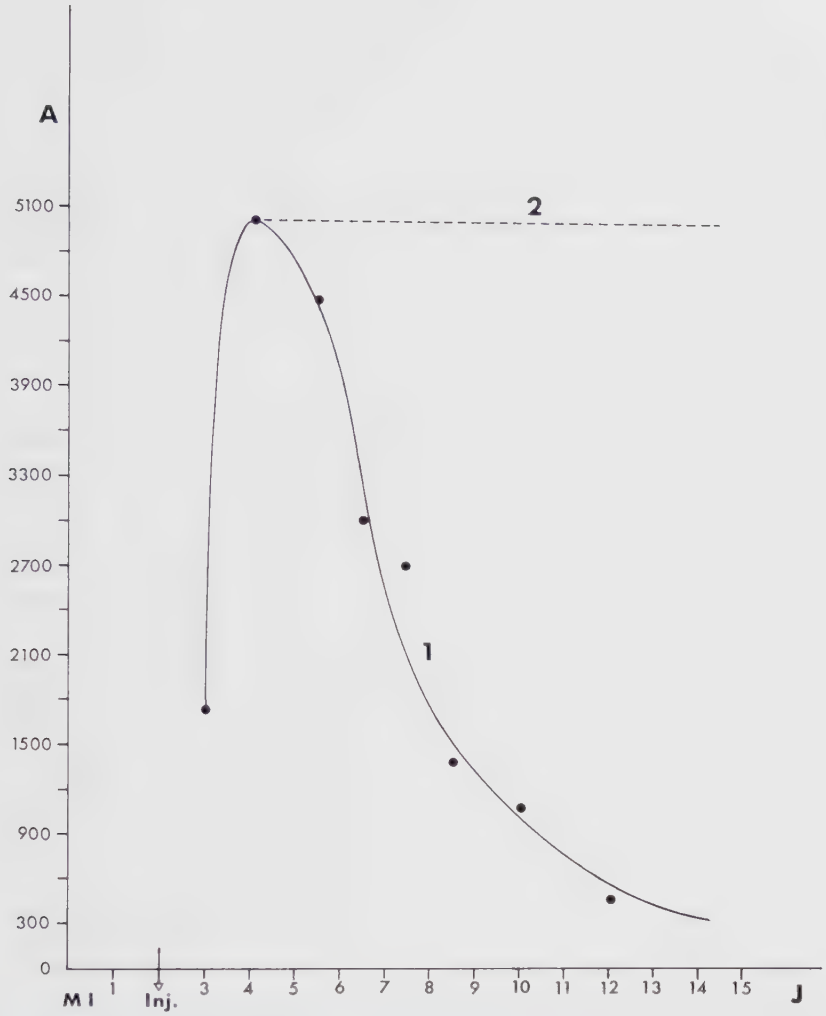


FIG. 8, Variations de la radio-activité des spermatophores, émis par un Grillon ayant reçu une injection unique de sulfate de sodium radio-actif (courbe 1).
En ordonnées : A = activité mesurée au compteur (c/mn) ;
En abscisses : jours (MI = mue imaginale; Inj = moment de l'injection). La courbe 2 représente la radio-activité probable des sécrétions des glandes annexes d'un Grillon maintenu à l'abri du contact d'une femelle, et dont la production des spermatophores est ainsi interrompue.

Par contre, les groupements — SII ou S-S sont décelables dans de très nombreux organes ou sécrétions. Le radiosulfate provoque une radio-activité intense de la plupart des tissus, malgré la pauvreté en polysaccharides, et cette radio-activité est bien conservée par les fixations alcooliques ou aqueuses.

Certains tissus contiennent des mucopolysaccharides et peu de protides histochimiquement décelables, d'autres un mélange des deux

sortes de composés. La plupart des organes à mucopolysaccharides ne retiendront pas l'attention, par suite de la nature carboxylée des glucides et de l'absence d'incorporation d'atomes de — ^{35}S : les sécrétions de certains tubes glandulaires mâles, les mucocytes des tubes de Malpighi (MARTOJA, 1961) sont dans ce cas.

Le *conjonctif* est le seul tissu qui incorpore le radiosulfate et peut donner exclusivement les réactions des mucopolysaccharides acides (réactions à l'APS, colorabilité par le bleu alcian, métachromasie γ). Peu développé chez les *Grylloidea*, il ne constitue d'accumulations importantes que dans l'axe des dents du gésier. Ailleurs, ce n'est qu'un mince réseau de fibres appliquées contre les membranes basales ou mêlées aux myofibres ou encore des formations lamellaires dont les mucopolysaccharides sont neutres, au moins dans des espèces voisines (ASHHURST, 1959, *Locusta*). Il est assez difficile d'apprécier le degré d'incorporation de la méthionine — ^{35} S dans ce tissu, qui est toujours accolé à d'autres tissus fixant intensément cet isotope. Dans certains cas favorables où la couche conjonctive est épaisse, la densité des grains d'argent est beaucoup plus faible à son niveau qu'à celui des tissus adjacents. Les images obtenues après traitement au radio-sulfate sont différentes : on observe également, et le fait sera expliqué plus loin, une importante radio-activité dans les tissus voisins, riches en — SH, mais la densité des radiographies est plus importante au niveau du conjonctif (pl. 9, fig. 9). Toute la radio-activité disparaît après méthylation, alors qu'elle persiste dans les tissus voisins. On doit donc penser que les ions sulfate, non dégradés, sont fixés par les mucopolysaccharides du conjonctif, bien que les groupements — SO_4 ne soient pas les seuls à estérifier ces polysaccharides : le test de la méthylation réversible, appliqué à l'étude des variations de la métachromasie, révèle la présence de carboxyles, et semble exclure celle des sulfates. Cette contradiction sera discutée ultérieurement.

Dans d'autres organes, les réactions des glucides autres que le glycogène sont nulles, et celles des protéines sylfhydrilées bien marquées. C'est le cas du corps gras, des œnocytes, des muscles, des glandes génitales, de divers épithéliums.

On sait que le cytoplasme du *corps gras* de la femelle est plus développé que celui du mâle (MARTOJA & LAUVERJAT, 1965). Dans les deux sexes, il contient des protides sulfhydrilés, mais la teneur en est plus grande chez la femelle. Corrélativement, c'est chez cette dernière que méthionine — ^{35} S et radiosulfate s'y incorporent le mieux, les images autoradiographiques observées après injection de l'un ou l'autre de ces isotopes étant concordantes. La méthylation est sans effet sur la radio-activité provoquée par le soufre dérivant du sulfate. Ce sont donc les protides soufrés qui sont marqués après emploi de soufre minéral.

Dans les deux sexes, les *œnocytes* sont identiques quant à leurs caractères histochimiques. Riches en groupements — SH, ces cellules incorporent aussi bien la méthionine que le sulfate radio-actifs. La persistance de la radio-activité après méthylation conduit à la même interprétation que pour les cellules adipeuses.

Les observations rapportées à propos des œnocytes sont applicables aux *fibres musculaires*.

Dans les *glandes génitales mâles*, la méthionine — ^{35} S confère une forte radio-activité aux cellules germinales, notamment aux spermatocytes. Dans les cystes à spermatozoïdes, c'est la paroi du cyste qui est la plus intensément radio-active. Les images radiographiques sont identiques après injection de radiosulfate, et la méthylation est sans effet sur la radio-activité. Si l'on considère que le cytoplasme des cellules sexuelles et celui de la paroi des cystes sont riches en protides soufrés, on doit penser ici encore que ce sont les amino-acides soufrés qui portent les atomes de soufre d'origine minérale.

Dans les *glandes génitales femelles*, les cellules folliculeuses acquièrent une forte radio-activité après injection de l'un ou l'autre des deux isotopes, minéral ou organique. Les résultats du test de la méthylation, ainsi que la richesse du cytoplasme en groupements — SH, suggèrent un passage du soufre d'origine minérale dans les protides. Le cas du vitellus, par contre, pose un problème d'une interprétation difficile. L'injection de radiosulfate est suivie d'une fixation de soufre dans les molécules organiques soufrées : résultats des méthodes histochimiques (richesse en — SH, absence de mucopolysaccharides « libres »), comparaison des radio-activités obtenues après emploi de la radiométhionine ou du radiosulfate, persistance de l'émission radio-active après méthylation, autant d'arguments qui sont en faveur d'une fixation du soufre d'origine minérale par les protides soufrés. Mais dans quelle mesure ces protides ne sont-ils pas mélangés à des mucopolysaccharides sulfatés qui échapperaient à la détection histochimique courante? Un traitement, d'une durée de 30 mn à 2 heures, par la pepsine, fait apparaître une très intense métachromasie γ au niveau des plaquettes vitellines. La présence de mucopolysaccharides « masqués » y est donc probable. Toutefois, il ne semble pas que ces composés masqués puissent fixer les ions — SO_4, le test de la méthylation réversible, pratiqué aprés démasquage, indiquant plutôt la présence de carboxyles à leur niveau. Mais nous discuterons ultérieurement de la valeur de cette méthode. Dans l'état actuel des recherches, on retiendra seulement qu'au moins une partie des atomes de soufre provenant du sulfate se retrouve dans des protides du vitellus.

Il n'est pas possible de se prononcer sur une éventuelle incorporation de radiosulfate par la gaine interne des ovarioles, dont certaines réactions sont celles des mucopolysaccharides. Celle-ci très mince, est au contact de cellules folliculeuses dont l'émission radio-active, trop importante, recouvre celle qui pourrait provenir de la gaine.

Pour les *divers épithéliums*, il ne sera question que des cellules épithéliales elles-mêmes, et non des revêtements sécrétés par certaines d'entre elles. J'envisagerai les épithéliums digestifs, en particulier ceux du segment lisse, du segment à villosités et de l'ampoule rectale, l'épithélium de l'appareil excréteur, à l'exclusion des cellules muqueuses, l'épithélium des glandes annexes de la chambre périvulvaire, les divers épithélium des tubes glandulaires annexes de l'appareil génital mâle. Toutes ces

cellules possèdent un ensemble de caractères communs : absence de polysaccharides autres que le glycogène, présence fréquente de protides sulfhydrilés, particulièrement abondants au niveau du segment lisse. Toutes incorporent aussi bien la méthionine que le sulfate radio-actif, et la radio-activité est uniformément répartie dans le cytoplasme (pl. 13, fig. 3). Dans le cas d'incorporation de méthionine, l'isotope est particulièrement abondant dans les cellules du mésentéron qui sont les plus riches en — SH. Quel que soit l'isotope utilisé, la méthylation ne provoque pas la disparition de la radio-activité. Le soufre radio-actif introduit sous forme minérale se localise donc dans les protides.

Dans le *tissu nerveux*, le cortex et le neuropile des ganglions ainsi que les fibres des nerfs, ne donnent aucune des réactions des mucopolysaccharides, mais sont riches en protides sulfhydrilés. Des mucopolysaccharides acides, bleu alcian positifs, existent, comme chez les blattes (Ashhurst, 1961) dans une couche sous-corticale riche en cellules à petits noyaux (3 à 5 μ). L'injection de radiométhionine ou de radiosulfate donne des images superposables, qui consistent en un marquage uniforme du cytoplasme du cortex et du neuropile, avec une intensité moindre dans la couche des polysaccharides. La méthylation est sans effet sur la radio-activité, ce qui signifie, ici encore, que tout le soufre est engagé dans les protides.

Pour les *glandes annexes de l'appareil génital mâle*, il n'existe à l'heure actuelle qu'une description histologique sommaire de ce grand ensemble glandulaire (Hirowo-Ito, 1924). L'application de méthodes histologiques insuffisantes n'a permis, à cet auteur, que la distinction de deux catégories de tubes glandulaires. Pourtant, méthodes de coloration trichromes ou techniques histochimiques font ressortir la richesse de ces tubes (plus de 800), en composés très variés : sécrétion morphologiquement et histochimiquement différentes sont réparties dans une dizaine de catégories de tubes glandulaires. Par suite du renouvellement rapide des sécrétions, qui permet le dépôt d'un spermatophore toutes les 24 heures, ces tubes se prêtent fort bien à des essais d'incorporation d'isotopes (pl. 9, fig. 1). Je ne traiterai ici que des tubes dont les sécrétions fixent les isotopes utilisés. Après injection de radiosulfate, l'atome de $-^{35}S$ est décelable dans quatre catégories de tubes qui se prêtent bien à une étude histochimique (tableau 6) : un premier groupe comprend un très grand nombre d'éléments situés latéralement, de chaque côté du réservoir glandulaire prolongeant le canal éjaculateur; ils débouchent dans cette poche sur ses bords latéraux droit et gauche. Le diamètre de ces tubes, très important, atteint 150 μ dans les parties distale et moyenne, 70 μ dans le segment proximal (*). Bien que les sécrétions, très denses, présentent des affinités tinctoriales inconstantes, ce qui pourrait résulter de degrés d'hydratation différents, les caractères histochimiques sont très constants.

(*) Comme Hirowo-Ito, je désigne par « segment distal » la partie d'un tube qui correspond à son extrémité aveugle, et par « segment proximal » celle qui est attenante au réservoir glandulaire.

Dans les conditions normales de détection spécifique des glucides, le produit de sécrétion donne toujours des résultats négatifs; il n'est pas, non plus, oxydable par l'acide périodique. Par contre, un traitement de deux heures par la pepsine cristallisée provoque l'apparition d'une métachromasie γ, qu'on peut rapporter à des polysaccharides masqués (pl. 9, fig. 2). Mais les groupements anioniques ainsi révélés sont de nature carboxylée, si l'on en croit les résultats du test de la méthylation réversible à 37 °C. Ces groupements ne pourraient donc pas intervenir dans la fixation des sulfates. Par ailleurs, la sécrétion, riche en protides, contient de la cystine et incorpore fortement la méthionine ainsi que le chlorhydrate de cystéine radio-actifs. Après injection de radiosulfate, la radio-activité est intense, surtout au niveau d'un anneau périphérique qui ne correspond à aucune localisation ou concentration particulières de composés histochimiquement décelables; sans doute cet aspect est-il la conséquence d'un phénomène de « fuite » (pl. 9, fig. 3, 7 et 8). Après méthylation à 60 °C, la radio-activité persiste, mais elle subit, si les pièces ont été fixées au Carnoy, une importante diminution d'intensité, alors que la perte de radio-activité est peu importante dans le cas de glandes fixées au formol (pl. 9, fig. 4-5-6). Dans le cas d'une fixation alcoolique, c'est au cours de la première heure du traitement par l'alcool méthylique-chlorhydrique que se produit l'extraction d'atomes radio-actifs; le traitement, prolongé ensuite pendant 24 heures, reste sans effet sur la radio-activité résiduelle. Cette dernière ne peut donc avoir pour origine que des protides soufrés. Les atomes extraits par la méthylation pourraient être liés à des amino-acides soufrés libres, hypothèse qui n'est pas en désaccord avec les données biochimiques. Mais les techniques chromatographiques ont montré que les ions SO_4 portaient presque tous les atomes radio-actifs des substances non engagées dans les liaisons protidiques. C'est donc à la présence de sulfates qu'on peut rapporter la radio-activité « labile » des sécrétions. Deux faits viennent à l'appui de cette interprétation : la fixation d'une intense radio-activité se produit dans ces tubes quelques minutes après l'injection de l'isotope minéral, dans des conditions de temps qui excluent toute possibilité d'une conversion massive de soufre minéral en soufre organique; ensuite, l'analyse chromatographique de quelques µl d'eau restée plusieurs heures en contact de coupes voisines de celles traitées par histo-autoradiographies (fixation au Carnoy), révèle seulement une tache radio-active, très intense, dont la position est celle du sulfate.

Donc, la sécrétion de ces tubes contient, après injection de radiosulfate, un mélange de sulfates et de protides soufrés radio-actifs.

— un deuxième groupe de tubes glandulaires forme un ensemble impair, situé ventralement par rapport au réservoir glandulaire; il débouche dans cette poche à la limite de ses parties antérieure et postérieure, très près du plan de symétrie de l'abdomen. Le calibre de ces tubes, très important dans la partie distale, va en diminuant dans le segment proximal. Le produit de sécrétion souvent rétracté au centre de la lumière, n'est pas très chromophile. Il est APS-positif, mais ne se colore que

faiblement par le bleu alcian. Il contient des amino-acides, notamment de la cystine, et incorpore aussi bien radiosulfate, méthionine ou chlorhydrate de cystéine radio-actifs. Comme dans les tubes précédents, la radio-activité produite par injection de radiosulfate persiste, bien qu'atténuée, après méthylation. Comme il n'y a pas lieu d'envisager l'existence de mucopolysaccharides masqués, la radio-activité résiduelle doit être rapportée aux protides soufrés.

— un troisième groupe est représenté par une formation paire, débouchant de part et d'autre de la partie dorsale du réservoir glandulaire. Il comprend des tubes étroits, situés dorso-latéralement dans l'abdomen. Très chromophile, la sécrétion retient les colorants acides. Elle n'est pas APS-positive et ne donne aucune des réactions des glucides. Les amino-acides à fonction phénol et ceux à groupements — SH sont abondants. La sécrétion incorpore la méthionine radio-active avec une remarquable intensité; il existe aussi une forte activité après injection de radiosulfate, et la méthylation ne provoque pas sa disparition. Dans cette sécrétion, l'atome de soufre provenant d'une source minérale se retrouve donc dans des protides soufrés.

En dehors de ce troisième groupe, il existe, dans l'ensemble glandulaire, d'autres faisceaux de tubes dont la localisation est différente, mais qui sont tout à fait comparables aux précédents quant aux caractères histochimiques de la sécrétion et à la fixation des isotopes.

— un quatrième groupe réunit des tubes formant deux ensembles pairs, qui débouchent latéralement de chaque côté du réservoir glandulaire. Il s'agit d'éléments d'un calibre moyen (40 μ), dont la paroi est très épaisse à l'apex. Leur produit de sécrétion est mixte, et comprend à la fois des grains et des filaments, qui constituent un mélange de proportions variables. Les grains ne possèdent aucun des caractères des glucides ou des glycoprotides; leur périphérie est très riche en groupements — SH. Les filaments, qui peuvent représenter une fraction infime de la sécrétion dans certains segments des tubes ou au contraire prédominer dans d'autres (pl. 10, fig. 2), ne donnent pas les réactions des protides, mais sont intensément colorables par le bleu alcian et le bleu de toluidine (métachromasie γ), un peu moins par l'acide periodique-Schiff. Cette sécrétion mixte incorpore intensément le soufre d'origine minérale; les segments des tubes dans lesquels les grains prédominent sont plus radio-actifs que ceux qui contiennent une plus grande proportion de filaments (pl. 10, fig. 1 et 2). D'autre part, les tests de la méthylation indiquent un mélange de carboxyles et de sulfates dans les filaments, et, par ailleurs, la méthylation à 60 °C est sans effet sur la radio-activité des grains. Ce sont donc surtout les protides des grains qui sont le siège de l'émission radio-active consécutive à une injection de radiosulfate.

Il reste à signaler que d'autres tubes glandulaires incorporent du soufre radio-actif. Mais il s'agit d'éléments peu nombreux, dispersés parmi d'autres tubes très différents, et ils se prêtent mal, de ce fait, à une étude d'histochimie comparée.

TABLEAU 6. — CARACTÈRES HISTOCHIMIQUES DES SÉCRÉTIONS INCORPORANT LE SOUFRE — 35 D'ORIGINE MINÉRALE, DANS LES GLANDES ANNEXES DE L'APPAREIL GÉNITAL MÂLE DE *Gryllus bimaculatus*.

1 : Métachromasie sans traitement préalable, à pH 4, 2;
2 : — après 4 heures de méthylation à 37 °C;
3 : — — méthylation suivie de saponification;
4 : — — traitement par la pepsine.

TUBES GLANDULAIRES	PROTIDES SULFHYDRILÉS			MUCOPOLYSACCHARIDES ACIDES					RADIO-ACTIVITÉ	RADIO-ACTIVITÉ $^{35}SO_4$			Nature histochimique des sécrétions incorporant le ^{35}S d'origine minérale.
					Métachromasie					normale	après lavage aqueux	après méthyl. à 60°	
	Chèvre mon	D.D.D	A.P.S.	Bleu alcian	1	2	3	4	^{35}S-Me				
Groupe 1	+	++	—	—	—			+	+++	+++	++	+	Protides soufrés sulfates
Groupe 2		++	+	±	—			—	++	++	+	+	Protides soufrés sulfates?
Groupe 3	++	++	—	—	—			—	++	++	?	+	Protides soufrés
Groupe 4													
Filaments	—	—	+	++	++	—	++		—	—			mucopolysaccharides sulfatés
Grains	++	++	—	—	—			—	++	++	++	+	Protides soufrés

Dans les tubes glandulaires de l'appareil génital mâle, ce sont donc à la fois des sulfates et des protides qui fixent l'atome de — ^{35} S provenant du sulfate. Les sécrétions de ces glandes sont assez pauvres en mucopolysaccharides acides; lorsqu'ils existent, ils sont de nature carboxylée. Se trouvant constamment mélangés à des sécrétions protidiques, ils pourraient sembler, lors d'un examen sommaire, être à l'origine de la radioactivité qui apparaît après injection de sulfate. Les contrôles montrent qu'il n'en est rien, et que les atomes radio-actifs sont incorporés dans les protides.

En *conclusion*, données biochimiques et histo-autoradiographiques démontrent la conversion du soufre minéral en soufre organique, chez le Grillon. Les atomes de soufre provenant du sulfate se trouvent engagés dans des protides et dans des amino-acides libres. Bien que la conversion soit quantitativement importante, une grande partie du soufre minéral persiste à l'état libre dans les sécrétions des glandes annexes mâles. Une faible partie estérifie les polysaccharides du tissu conjonctif et des glandes.

β. *Gryllotalpidae* (*Gryllotalpa gryllotalpa*).

La recherche de la destinée du soufre minéral, chez les *Grylloidea* différant des *Gryllidae*, n'a pu être abordée que chez *Gryllotalpa gryllotalpa*, et par la seule méthode histo-autoradiographique.

Les résultats sont en tous points superposables à ceux qui ont été obtenus chez *Gryllus*, qu'il s'agisse du cytoplasme des organes ou des sécrétions qui élaborent les spermatophores, celles-ci étant morphologiquement et histochimiquement très proches de celles des grillons. Il existe toujours une concordance rigoureuse entre la teneur en protides sulfhydrilés et la présence d'atomes radio-actifs résistant à la méthylation à 60 °C. L'acidité des mucopolysaccharides, à l'exclusion de ceux du tissu conjonctif, est due à des carboxyles. Chez la Courtilière, il existe donc une conversion de soufre minéral en soufre organique. D'après l'intensité du rayonnement conservé malgré la méthylation, on peut estimer que cette conversion représente un processus aussi important que chez les grillons.

Légendes de la planche

PLANCHE IX

Incorporation du soufre—^{35}S minéral, chez *Gryllus bimaculatus*.

Fig. 1, Coupe transversale de l'abdomen d'un imago mâle, 5 jours après l'injection (Carnoy, hémalun, autoradiographie, 20 diamètres). Au réservoir glandulaire (R) s'abouchent de nombreux tubes, dont beaucoup sont radio-actifs (en noir).

Fig. 2, Tube glandulaire de première catégorie (Pepsine-bleu de toluidine, 200 diamètres). Noter le découpage de la sécrétion en polygones, et la présence de polysaccharides acides démasqués par l'enzyme.

Fig. 3, Tubes glandulaires de première catégorie (Carnoy, autoradiographie-vert de méthyle pyronine, 50 diamètres).

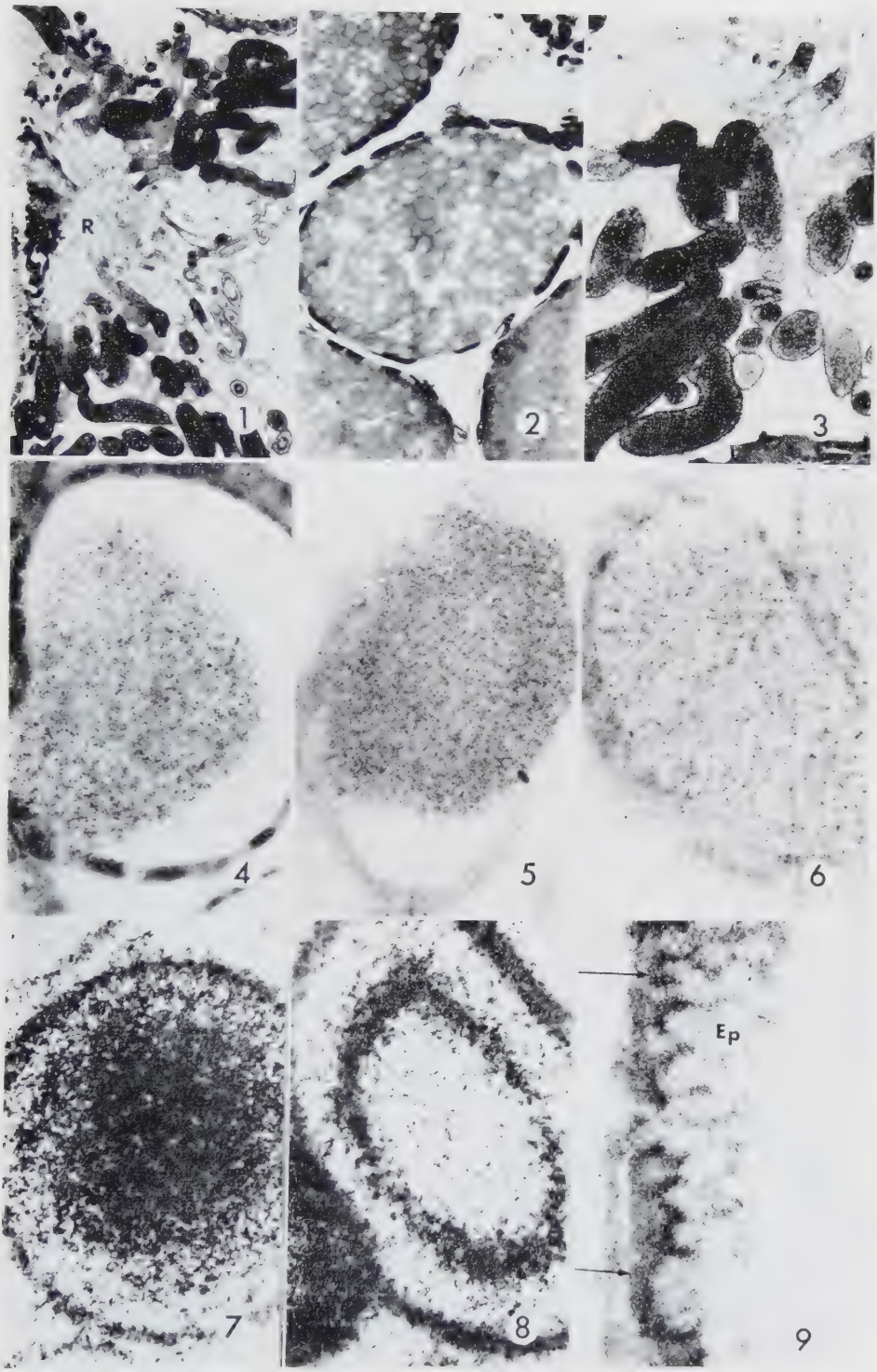
Fig. 4, Mêmes tubes glandulaires, mais fixés au formol salé (formol-autoradiographie-vert de méthyle pyronine, 280 diamètres). Comparer la radio-activité avec celle des tubes fixés au Carnoy (clichés 3 ou 7).

Fig. 5, Même tube et même fixation que cliché 4, mais traitement par l'eau chaude avant le couchage de l'émulsion (formol-eau chaude-autoradiographie-vert de méthyle pyronine, 280 diamètres).

Fig. 6, Tube de première catégorie, fixé au formol, et méthylé 3 heures à 60 °C (formol-méthylation-autoradiographie-vert de méthyle pyronine, 280 diamètres). La radio-activité résiduelle est due aux protides. Noter que la perte de radio-activité provoquée par le traitement à l'eau chaude (cliché 5) ou la méthylation (cliché 6) est peu perceptible après fixation aqueuse.

Fig. 7 et 8, Tubes de première catégorie, fixés au Carnoy, et colorés rapidement à l'A.P.S. avant le couchage de l'émulsion (300 diamètres). Noter les phénomènes de fuite, et la radio-activité plus intense qu'après fixation formolée, bien que les coupes aient été hydratées (adsorption des sulfates ou d'amino-acides libres, qui seront éliminés par méthylation?).

Fig. 9, Paroi du mésentéron (formol, autoradiographie, pas de coloration de fond, 130 diamètres). Noter la radio-activité plus intense dans la couche conjonctive (flèches) que dans l'épithélium (Ep).


R
1
2
3
4
5
6
7
8
Ep
9

b) Espèces dépourvues de segment bactérien

α) *Acridoidea* (*Locusta migratoria*).

De jeunes imagos des deux sexes de *Locusta* reçoivent, comme les grillons, 50 μC par g d'Insecte, d'une solution stérile de radiosulfate de sodium. La recherche des amino-acides radio-actifs par radiochromatographie de broyats d'organes nécessite que le chromatogramme reste longtemps au contact de l'émulsion sensible : une durée d'exposition

Légendes de la planche

PLANCHE X

Incorporation du soufre—^{35} minéral chez *Gryllus bimaculatus*.

Fig. 1 et 2, Tubes glandulaires de 4^{e} catégorie :
1 : formol-hémalun-autoradiographie, 150 diamètres;
2 : coupe voisine, bleu alcian-rouge solide, 150 diamètres;
R : réservoir glandulaire; sur le cliché 2, les sections colorées (grises) correspondent aux segments riches en filaments de mucopolysaccharides acides et pauvres en grains protidiques; les sections non colorées (G) aux segments à grains protidiques seuls.
La comparaison des deux clichés démontre que la radioactivité est plus intense dans les sections où les grains protidiques prédominent.

Fig. 3, Fragment d'iléon d'un Grillon traité à la tifomycine avant l'injection de $^{35}SO_4Na_2$ (Carnoy-hémalun-autoradiographie, 80 diamètres). Remarquer la radio-activité dans les bactéries disposées en couronne autour des papilles (P) et dans celles qui sont extérieures aux papilles (flèche). B : bol alimentaire.

Fig. 4 et 5, Tubes de Malpighi et collecteur commun, chez un Grillon traité à la terramycine avant l'injection de l'isotope minéral.
4 : formol-autoradiographie-vert de méthyle pyronine;
5 : Trichrome de R.H. y Cajal, 50 diamètres.
La radioactivité est plus importante dans la tunique conjonctive (TC), mais elle n'est pas négligeable dans l'épithélium des tubes de Malpighi.

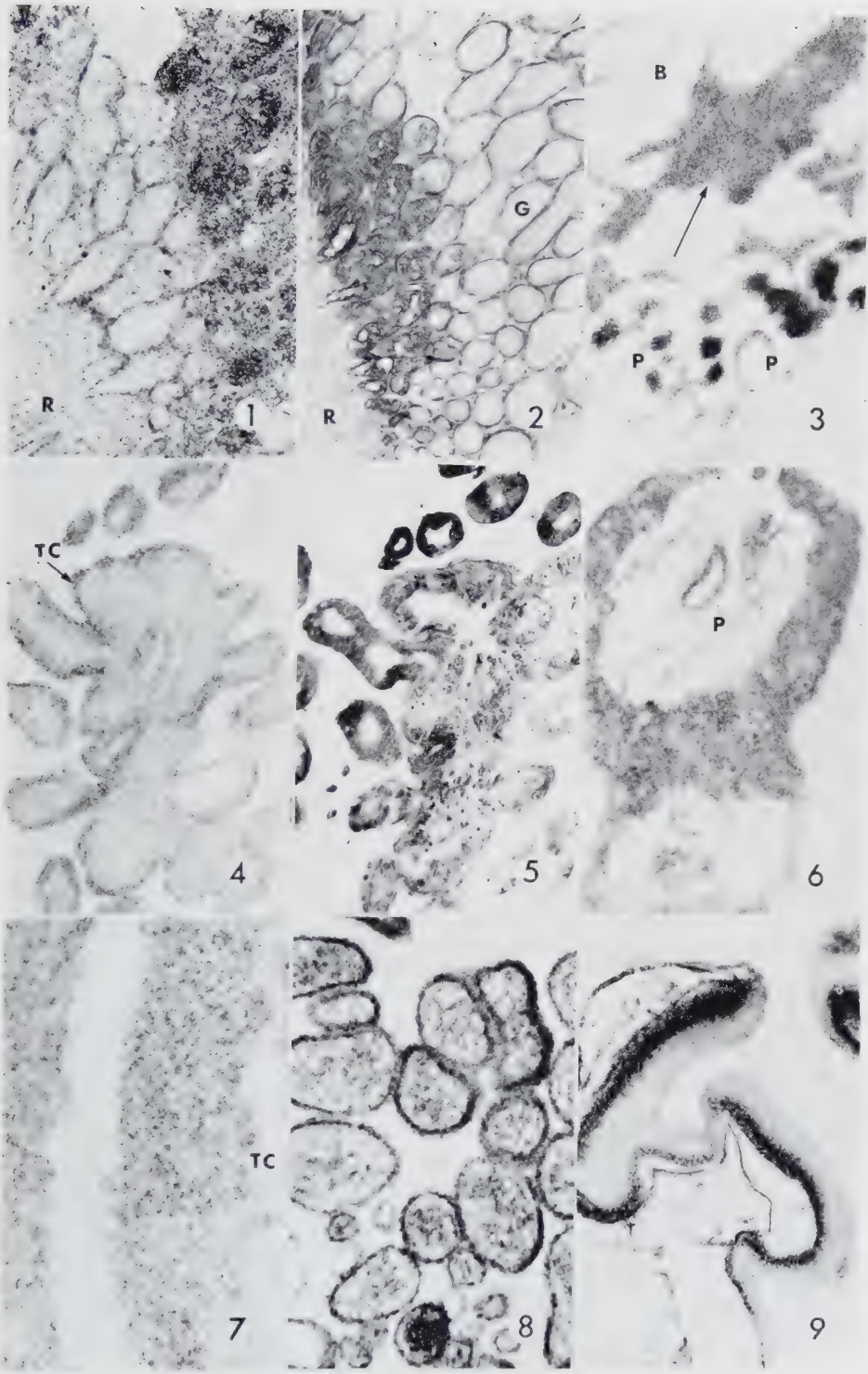
Fig. 6, Même insecte que précédemment. Coupe dans l'iléon (formol-autoradiographie-vert de méthyle pyronine, 200 diamètres). Les bactéries sont moins abondantes au niveau de la papille (P) qu'à l'extérieur de cette papille; la radio-activité est proportionnelle à la densité bactérienne.

Fig. 7, Paroi du mésentéron, chez un Grillon traité à la tétracycline avant l'injection du sulfate radio-actif. (Carnoy-méthylation de 3 h à 60 °C, autoradiographie, 130 diamètres).
La méthylation a fait disparaître la radio-activité du tissu conjonctif (TC) (comparer avec la fig. 9, pl. 9); les cellules épithéliales conservent leur radio-activité.

Utilisation de l'urée radio-active par *Gryllus bimaculatus* :

Fig. 8, Tubes glandulaires annexes de l'appareil génital mâle d'un Grillon ayant ingéré de l'urée-14-C, et fixé une semaine plus tard (Carnoy-hémalun-autoradiographie, 150 diamètres). Noter l'intense radio-activité dans les sécrétions des tubes (sécrétions protidiques).

Fig. 9, Coupe du tégument d'un Grillon identique au précédent (Carnoy-hémalun-autoradiographie, 100 diamètres). Noter la radio-activité des couches profondes de la cuticule.


R
1
R
G
2
B
P
P
3
TC
4
5
P
6
TC
7
8
9

quatre fois plus longue que dans le cas des Grillons ne révèle que des spots radio-actifs extrêmement faibles, voire nuls pour certains lots. Les positions de ces spots sont les suivants :

Systèmes de solvants	Glandes annexes mâles	Reste du corps (sauf tube digestif)
1	pas de radioactivité	0,50
2	—	0,85
4	—	0,44
5	—	0,53
6	—	0,75 à 0,95

Le seul composé radio-actif qui présente une activité décelable, bien que située à la limite de sensibilité de la méthode, est la méthionine. Une infime partie du sulfate est donc convertie. Dans les extraits alcooliques des glandes annexes, seuls des ions $^{35}SO_4$, d'ailleurs très abondants, sont identifiables; dans ceux du « reste du corps », il existe des sulfates et des traces de méthionine. Les données du tableau font apparaître l'absence d'amino-acides radio-actifs dans les protides des glandes annexes mâles. Pourtant, bien que ces tubes glandulaires soient moins nombreux que chez les *Grylloidea* (30 tubes seulement, Hirowo-Ito, 1924), l'examen histo-autoradiographique révèle qu'une radio-activité considérable apparaît dans ces tubes après injection de radiosulfate.

Comme chez les grillons, les *glandes annexes* comprennent plusieurs catégories glandulaires. Mais ici, par suite de la conformation anatomique de ces éléments, qui constituent, de chaque côté de l'abdomen, un ensemble très aplati, il est difficile de caractériser les tubes par leur position anatomique. De plus, alors que chez les Ensifères, les divers tubes glandulaires conservent les mêmes caractères jusqu'à leur débouché dans le réservoir, chez les Caelifères chaque tube se modifie profondément au niveau de son segment proximal, avant la pénétration dans le canal éjaculateur : tous les tubes subissent une modification identique consistant en un épaississement de la musculeuse, l'apparition d'une lame conjonctive sous-épithéliale, et surtout un rétrécissement de la lumière dans laquelle la sécrétion devient trop rare pour qu'il soit possible d'y retrouver les éléments caractérisés dans un segment plus distal (pl. 13, fig. 2). De ce fait, il ne sera tenu compte que de « sections de tubes », indépendamment de considérations anatomiques (tableau 7).

Un premier aspect groupe des sections de calibre élevé (250 μ), à paroi mince (8 μ), qui contiennent une sécrétion légèrement A.P.S.- positive, pauvre en protides sulfhydrilés, et n'incorporant la méthionine —^{35}S qu'avec une faible intensité. Il semble que les cellules épithéliales élaborent un composé qui donne, avec une faible intensité, les réactions des mucopolysaccharides acides carboxylés, mais dont les caractères histochimiques s'atténuent lorsque la masse de la sécrétion devient trop abondante. C'est pourquoi je placerai dans la même catégorie des sections de plus

faible diamètre (150 μ) dont la sécrétion, peu abondante encore, comprend une masse de polysaccharides chromophiles associés à des granules riches en groupements —SH, et qui forment des enclaves dans la masse principale des polysaccharides, ou des lambeaux accolés à elle (pl. 12, fig. 1 et 2). Après injection de radiosulfate et fixation au Carnoy, la radio-activité émise par l'ensemble de la sécrétion est très forte, mais elle est éliminée presque totalement par méthylation. Un très petit nombre d'atomes de —^{35}S se trouve donc engagé dans les protides soufrés.

Un deuxième aspect comprend quelques tubes de plus faible diamètre (200 μ), à paroi mince (8 μ), dont la sécrétion, bien qu'homogène, se révèle complexe. On y décèle un mélange de protides sulfhydrilés et de muco-polysaccharides carboxylés, colorables par le bleu alcian, l'ensemble de cette sécrétion donnant une teinte rouge intense après réaction à l'A.P.S. Méthionine-35-S et radiosulfate y provoquent une émission radio-active de même intensité; mais la proportion des atomes de —^{35}S provenant du sulfate et pouvant être engagée dans des protides, doit être faible, car la radio-activité due au sulfate résiste mal à la méthylation (pl. 12, fig. 3, 4, 5).

Dans un troisième groupe de sections, d'un calibre de 300 à 400 μ pour une épaisseur de paroi de 20 à 50 μ, les réactions des glucides sont nulles, celles des protides sulfhydrilés très intenses. Le soufre y est incorporé après injection de radiosulfate. Mais une très faible partie de la radio-activité persiste après méthylation : peu de soufre se trouve donc engagé dans les protides soufrés (pl. 12, fig. 6 et 7).

Un quatrième ensemble de sections, dont le calibre est de 150 μ et l'épaisseur de la paroi de 8 μ, contient une sécrétion homogène dépourvue de protides sulfhydrilés, mais riche en mucopolysaccharides acides. Dans ces composés, les groupements anioniques sont nombreux au point de saturer les fonctions oxydables par l'acide périodique; la méthylation réversible n'y révèle que des carboxyles. La radio-activité produite par injection de radiosulfate est très intense, mais disparaît totalement par méthylation. Données histochimiques et histo-autoradiographiques permettent donc d'exclure toute incorporation de soufre—35 dans les protides de ces sécrétions (pl. 12, fig. 8 et 9).

Un cinquième ensemble de sections, de calibre élevé (300 μ) et de paroi épaisse (40 μ), contient une sécrétion granuleuse après fixation alcoolique, et dont les éléments, APS-positifs, sont dépourvus de polysaccharides mais sont riches en groupements —SH. L'incorporation de soufre radio-actif d'origine minérale y est assez faible, et la radio-activité ne résiste pas à la méthylation. Les groupements —SH de cette sécrétion ne contiennent donc pas d'atomes de —^{35}S d'origine minérale.

Deux points sont à signaler à propos de la radio-activité provoquée par le radiosulfate dans ces divers tubes glandulaires. En premier lieu, après fixation au formol salé, la radio-activité émise est beaucoup plus faible qu'après fixation alcoolique (Carnoy). Dans le cas d'une fixation aqueuse, la méthylation provoque alors une perte de radio-activité moins considérable; mais la radio-activité résiduelle, due aux protides soufrés, est très faible et comparable pour les deux types de fixation. Ce résultat

TABLEAU 7. — CARACTÈRES HISTOCHIMIQUES DES SÉCRÉTIONS INCORPORANT LE SOUFRE –35 D'ORIGINE MINÉRALE, DANS LES GLANDES ANNEXES DE L'APPAREIL GÉNITAL MÂLE DE *Locusta migratoria*.

1 : métachromasie sans traitement préalable, à pH 4,2;
2 : — après 4 h de méthylation à 37 °C;
3 : — — méthylation suivie de saponification.

SECTIONS GLANDULAIRES	PROTIDES SULFHYDRILÉS		A.P.S.	MUCOPOLYSACCHARIDES ACIDES				RADIO-ACTIVITÉ ^{35}S-Me	RADIO-ACTIVITÉ $^{35}SO_4$		NATURE HISTOCHIMIQUE DES SÉCRÉTIONS INCORPORANT LE ^{35}S D'ORIGINE MINÉRALE.
					MÉTACHROMASIE						
	Chèvre-mont	D.D.D		Bleu alcian	1	2	3		normale	après méthyl. à 60 °C	
1re catégorie	+	+	+	±	±	—	±	?	++	—	Protides soufrés (traces)
(suivant niveau)	+++	+++	++	+++	++	—	++	±	+++	±	Sulfates Mucopolysaccharides?
2e catégorie	++	++	+++	+	++	—	++	+++	+++	+ ou ±	Protides soufrés Sulfates Mucopolysaccharides?
3e catégorie	+++	+++	—	—	—			+++	+++	+ ou ±	Protides soufrés (traces) Sulfates
4e catégorie	—	—	—	+++	++	—	++	—	++	—	Sulfates Mucopolysaccharides?
5e catégorie	+++	+++	+	—	—			++	+	—	Sulfates Mucopolysaccharides?

permet de penser que la fixation alcoolique immobilise une grande partie du sulfate, résultat en accord avec les essais préliminaires dont il a été question précédemment, et également avec les données biochimiques concernant l'extraction d'ions $-^{35}SO_4$ de ces glandes par l'alcool faible, à chaud. En second lieu, la variabilité dans l'intensité des autoradiographies pratiquées après certaines colorations assez longues (A.P.S.) pourrait également être le fait d'une dissolution progressive des sulfates adsorbés par les sécrétions.

Parmi les autres organes de *Locusta*, la radio-activité provoquée par injection de radiosulfate est importante dans le *tissu conjonctif* surtout dans celui de la paroi du tube digestif, très développé au niveau de la valvule proctodéale. Dépourvu de protides sulfhydrilés histochimiquement identifiables, ce tissu donne les réactions des mucopolysaccharides avec une forte intensité. Si le test de la méthylation réversible y révèle l'existence de groupements carboxyles, à l'exclusion de sulfates, il semble difficile de ne pas admettre la présence simultanée des deux types de groupements anioniques, pour expliquer la disparition rapide de la radio-activité, causée par la méthylation; l'émission radio-active résiste, en effet, aux longs traitements histologiques et à l'extraction par l'eau; elle ne peut avoir pour origine des ions sulfates libres. Sans doute la radio-activité décelable dans le conjonctif a-t-elle pour origine des polysaccharides sulfatés, mélangés à des polysaccharides carboxylés; mais des recherches complémentaires s'imposent avant de conclure.

Certaines autres structures, apparentées au tissu conjonctif, fixent le radiosulfate, et les tests histochimiques permettent de conclure dans le même sens que pour le conjonctif. Il s'agit d'une lame épaisse qui sépare, dans le segment proximal des tubes glandulaires mâles, la musculeuse de l'épithélium, et qui fixe le soufre radio-actif quand le radiosulfate est administré peu avant la mue imaginale, stade où cette lame est en formation (pl. 13, fig. 1 et 2). Il s'agit aussi d'un tissu particulier qui constitue l'enveloppe externe du canal éjaculateur, sorte de manchon qui présente beaucoup d'analogies avec un cartilage (pl. 12, fig. 10) (*); la fixation de radiosulfate dans sa substance fondamentale accentue l'analogie qu'il présente avec le cartilage.

Enfin, une très faible radio-activité apparaît dans la plupart des organes des criquets injectés au radiosulfate. Bien souvent, l'émission radio-active est à peine supérieure au « bruit de fond », mais elle persiste après méthylation. Elle existe au niveau des organes riches en groupements —SH : corps gras des femelles, flagelles des spermatozoïdes dans les canaux déférents (pl. 12, fig. 11 et 12), divers épithéliums.

En conclusion, données biochimiques et histo-autoradiographiques ne révèlent qu'une très faible conversion du soufre minéral en soufre organique. Elles montrent que les ions sulfate sont retenus, avec une exceptionnelle intensité, dans les sécrétions des glandes mâles. Le tissu conjonctif et d'autres formations apparentées retiennent également les atomes de ^{35}-S non réduits, dans leurs polysaccharides.

β) *Tettigoniidae* (*Tettigonia viridissima*, *Orphania denticauda*).

Dans les mêmes conditions techniques de chromatographie de broyats de sauterelles injectées au radiosulfate, la recherche des amino-acides soufrés nécessite des temps d'exposition assez longs (8 semaines). La radio-activité des chromatogrammes est alors intermédiaire entre celle des radiochromatogrammes de grillons (exposition 3 semaines) et de criquets (exposition 12 semaines). Pour réunir une quantité de substance suffisante, j'ai traité l'ensemble des organes de *Tettigonia*, à l'exclusion du tube digestif. Comme il n'était pas possible de renouveler l'expérience un grand nombre de fois, les Insectes provenant de captures sur le terrain, la recherche des amino-acides dans les glandes annexes mâles n'a pas été envisagée par chromatographie.

Pour tous les systèmes de solvants utilisés, deux taches radio-actives, faibles, ont pour origine des composés réagissant de façon positive à la ninhydrine; l'une est la méthionine, l'autre la cystine. Parfois un autre spot, de radio-activité très faible, semble correspondre à la cystéine. Aucun autre composé radio-actif n'existe sur les radiochromatogrammes.

Les méthodes histo-autoradiographiques de recherche du soufre ont été appliquées à *Tettigonia* et *Orphania ;* elles ont donné des résultats

(*) L'histologie et l'ultrastructure de ce tissu sont décrits dans *C.R. Acad. Sc.*, 1965, 261, p. 2954-2957.

identiques, les pièces étant fixées au Carnoy et le couchage de l'émulsion effectué après coloration rapide des coupes, à l'hémalun. Étant donné la très grande similitude des organes de ces deux Tettigonides, je m'en tiendrai à la description d'*Orphania*.

Les travées cytoplasmiques du *corps grar* et les *fibres musculaires* sont radio-actives après injection de radiosulfate. Ces tissus sont dépourvus de polysaccharides différant du glycogène, mais sont riches en protides sulfhydrilés. La méthylation à 60 °C est sans effet sur l'émission radio-active; le soufre—35 qui existe dans ces tissus a donc pour origine des amino-acides soufrés. Comme dans les autres espèces précédemment envisagées, ce sont encore les *glandes annexes* de l'appareil génital mâle qui représentent le lieu de fixation le plus important pour l'isotope. Chez les Tettigonides comme dans les autres groupes d'Orthoptères, aucune étude histologique n'a été entreprise sur ces organes, depuis Hirowo-Ito (1924); il est donc nécessaire de donner quelques indications sommaires sur l'histologie de cet appareil complexe. Comme chez les *Grylloidea*, il existe un très grand nombre de tubes glandulaires, mais,

Légendes de la planche

PLANCHE XI

Incorporation du soufre minéral chez *Orphania* (glandes annexes mâles).

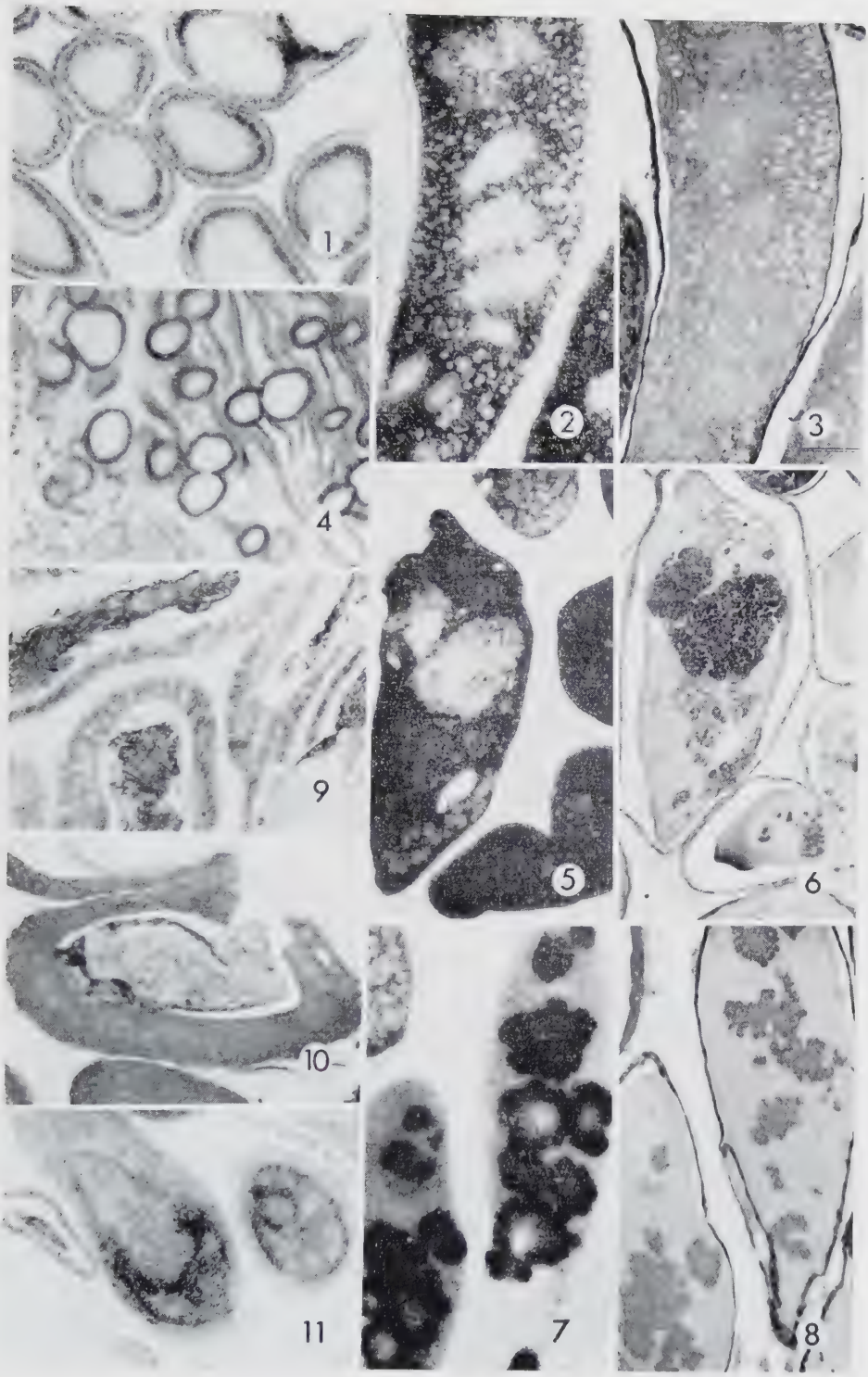
Fig. 1, Tubes de première catégorie (Carnoy-hémalun-autoradiographie, 150 diamètres). Noter la disposition en couronne des éléments radio-actifs; comparer avec la fig. 8, pl. 8).

Fig. 2, 3 et 4, Tubes de deuxième catégorie :
2 : Carnoy-hémalun-autoradiographie, 50 diamètres;
3 : Carnoy-bleu de toluidine, 50 diamètres;
4 : Carnoy-ferricyanure ferrique, 500 diamètres.
La comparaison des clichés 2 et 3 montre que la radio-activité est donnée par un fond métachromatique, mais non par des grains et des plages. Le cliché 4 montre les filaments du fond, et la coque des grains, riche en — SH.

Fig. 5 et 6, Tubes de deuxième catégorie;
5, Carnoy-hémalun-autoradiographie, 50 diamètres;
6, Carnoy-bleu alcian, hémalun, orangé G, 50 diamètres.
La radio-activité est importante sur la sécrétion principale (en gris sur 6), nulle sur les masses de grains (en noir sur 6).

Fig. 7 et 8, Tubes de deuxième catégorie :
7 : Carnoy-hémalun-autoradiographie, 50 diamètres;
8 : Carnoy-réaction au D.D.D., 50 diamètres.
La comparaison des deux clichés montre que les plages riches en protides sulfhydrilés sont les plus intensément radio-actives.

Fig. 9, 10 et 11, Tubes de troisième catégorie :
9 : bleu alcian-rouge solide, 100 diamètres. La sécrétion principale est intensément colorée par le bleu alcian;
10 : réaction au D.D.D., 120 diamètres. Les protides sulfhydrilés sont disposés à la périphérie de la sécrétion précédente.
11 : Carnoy-hémalun-autoradiographie, 100 diamètres. Les couches périphériques de la sécrétion, riches en — SH, sont les plus intensément radio-actives.


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11

ici, ces tubes débouchent dans deux réservoirs glandulaires pairs, dont chacun reçoit des tubes homologues quant à la nature de leur sécrétion. Il existe plusieurs catégories de sécrétions, mais seules seront envisagées celles qui fixent le soufre radio-actif d'origine minérale (tableau 8).

Une première catégorie de tubes comprend un grand nombre d'éléments qui débouchent de chaque côté des deux réservoirs. Leur calibre va de 150 à 200 μ, et leur épithélium a une épaisseur de 10 μ. La sécrétion de ces tubes, souvent découpée en polygones, ne donne aucune des réactions des glucides; par contre, les protides sulfhydrilés sont abondants. La radio-activité est assez importante surtout au niveau d'une couronne périphérique qui ne correspond à aucune structure sous-jacente histochimiquement différenciée, et qui pourrait résulter d'un « phénomène de fuite » (pl. 11, fig. 1) (cf. les tubes de première catégorie des grillons). Après méthylation à 60 °C, la méthylation persiste, bien que très affaiblie, surtout au niveau de cette couronne. La radio-activité résiduelle correspond donc à des protides soufrés.

Une deuxième catégorie de tubes comprend des éléments très nombreux d'un calibre élevé (600 à 700 μ), situés ventralement dans l'abdomen, et qui se rassemblent dans deux poches attenantes aux réservoirs glan-

Légendes de la planche

PLANCHE XII

Incorporation du soufre minéral radio-actif chez *Locusta migratoria*.

Fig. 1 et 2, Sections glandulaires de première catégorie :
1 : Bleu alcian-hémalun-Cleveland, 160 diamètres. La masse principale de la sécrétion est constituée de polysaccharides acides; à la périphérie, des protides (flèches) colorables par l'orangé G;
2 : Carnoy-hémalun-autoradiographie, 160 diamètres. Remarquer l'intense radio-activité sur la sécrétion principale, riche en mucopolysaccharides.

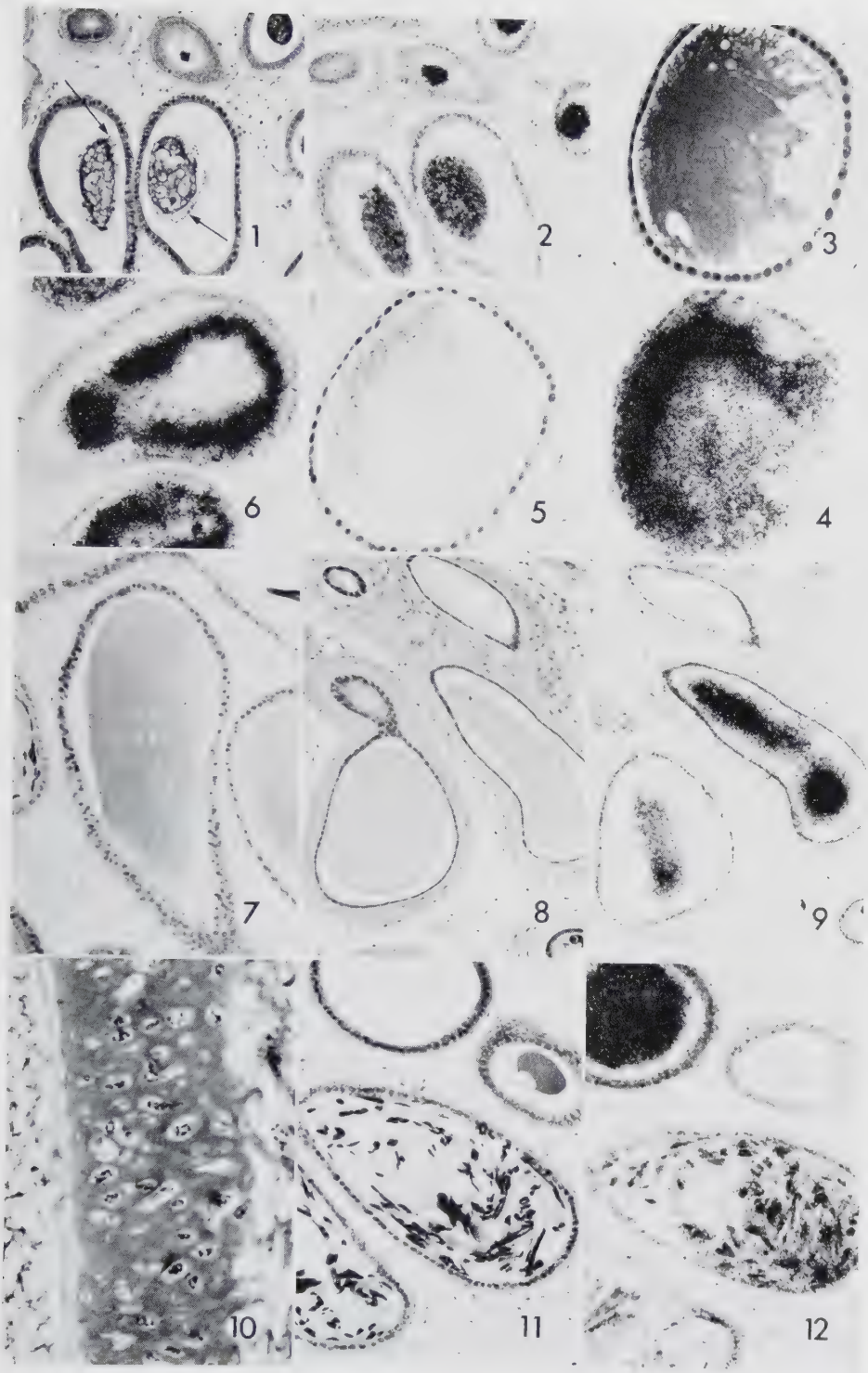
Fig. 3, 4 et 5, Sections glandulaires de deuxième catégorie :
3 : Acide périodique-Schiff-hémalun-jaune de mars, 150 diamètres;
4 : Carnoy-hémalun-autoradiographie;
5 : Carnoy-méthylation de 1 h à 60 °C, hémalun-autoradiographie.
On constate qu'une heure de méthylation suffit pour éliminer la plus grande partie de la radio-activité.

Fig. 6 et 7, Sections glandulaires de troisième catégorie :
6 : Carnoy-hémalun-autoradiographie. 70 diamètres;
7 : Ferricyanure ferrique, 70 diamètres.

Fig. 8 et 9, Sections glandulaires de quatrième catégorie:
8 : Carnoy-hémalun, 70 diamètres;
9 : Carnoy-hémalun-autoradiographie, 70 diamètres.

Fig. 10, Manchon de tissu cartilagineux entourant le segment antérieur du canal éjaculateur (Azan, 320 diamètres).

Fig. 11 et 12, Sections du canal déférent (100 diamètres).
11 : Bleu alcian-hémalun-piero-indigocarmin;
13 : Carnoy-hémalun-autoradiographie.
Remarquer la radio-activité des flagelles des spermatozoïdes.


1
2
3
6
5
4
7
8
9
10
11
12

dulaires. Par suite du diamètre élevé de ces tubes, leur paroi paraît excessivement mince (8 μ). La sécrétion est très complexe tant sur le plan morphologique qu'histochimique. On y distingue :

— une sécrétion principale hétérogène, où certaines méthodes (APS; métachromasie après méthylation réversible) révèlent des éléments filamenteux plus intensément colorables que le reste de la sécrétion principale (pl. 11, fig. 4). L'ensemble est un mélange de mucopolysaccharides acides et de protides, dont des protides sulfhydrilés. Elle fixe les atomes de ^{35}-S d'origine minérale, et conserve sa radio-activité, bien que très atténuée, après méthylation. Si l'on considère que les mucopolysaccharides sont de nature carboxylée (tableau 8), on doit conclure que les atomes de ^{35}-S éliminés par méthylation ne correspondent qu'à des sulfates libres. La faible proportion des atomes qui résistent à la méthylation sont incorporés aux protides soufrés.

— des plages granuleuses, dont les grains contiennent des groupements SH. Elles ne fixent pas l'isotope (pl. 11, fig. 5 et 6).

— des sphères, intensément colorables par l'orangé G molybdique. Elles ne contiennent pas de mucopolysaccharides, mais des groupements —SH répartis à leur périphérie (coque) (pl. 11, fig. 4). Par suite de cette localisation périphérique, les seuls éléments soufrés de ces sphères se trouvent au contact de la sécrétion principale qui fixe le radiosulfate; il n'est donc pas possible de se prononcer sur une éventuelle émission radio-active par la coque des sphères.

— des plages homogènes, de forme très variable, qui sont dépourvues de polysaccharides, mais extrêmement riches en protides sulfhydrilés. Ce sont les sécrétions les plus intensément radio-actives, après la sécrétion principale. La méthylation ne provoque qu'un affaiblissement de l'émission qui a donc pour origine, en partie du moins, des protides soufrés (pl. 11, fig. 7 et 8).

Un troisième groupe comprend un assez petit nombre de tubes qui sont situés dorsalement dans l'abdomen, et qui débouchent sur la face dorsale de chacun des deux réservoirs glandulaires. Leur calibre est de 200 μ, leur épithélium a une épaisseur de 40 μ et leur lumière est relativement réduite (pl. 11, fig. 9, 10 et 11). La sécrétion est double. L'une occupe le centre des tubes; elle est formée de mucopolysaccharides carboxylés et sulfatés et ne fixe que faiblement le soufre radio-actif d'origine minérale. L'autre, souvent localisée à la périphérie de la précédente, ne donne qua les réactions des protides (—SH notamment); elle fixe très intensément le radiosulfate, et conserve une partie de sa radio-activité après méthylation. Dans cette sécrétion double, une partie de la radio-activité a donc surtout pour origine des protides.

Enfin, d'importantes *nappes bactériennes* situées dans l'ampoule rectale sont radio-actives et le restent pendant la semaine qui suit l'injection. Sans doute s'agit-il là de micro-organismes plus ou moins permanents.

TABLEAU 8. — CARACTÈRES HISTOCHIMIQUES DES SÉCRÉTIONS INCORPORANT LE SOUFRE —35 D'ORIGINE MINÉRALE, DANS LES GLANDES ANNEXES DE L'APPAREIL GÉNITAL MÂLE D'*Orphania denticauda*.

1 : métachromasie sans traitement préalable, à pH 4, 2;
2 : — après 4 h de méthylation à 37 °C;
3 : — — méthylation suivie de saponification.

TUBES GLANDULAIRES	PROTIDES SULFHYDRILÉS			MUCOPOLYSACCHARIDES ACIDES				RADIO-ACTIVITÉ $^{35}SO_4$		NATURE HISTOCHIMIQUE DES SÉCRÉTIONS INCORPORANT LE ^{35}S D'ORIGINE MINÉRALE
	CLEVELAND	Chèvre mont	DDD	APS	Métachromasie Bleu alcian	1	2	3	normale	après méthyl à 60 °C	
1re catégorie.....	++	+++	+	—	—	—			++	+	Protides soufrés Sulfates
2e catégorie — sécrétion principale	—	+	+	±	+	+	—	+	+++	+	Protides soufrés Sulfates ou Mucopolysaccharides acides?
— sphères centre	+++	—	—	—	—	—			—		
— sphères coque	+++	++	++	—	—	—			?		
— Plages homogènes	—	++	+++	+	—	—			+++	+	Protides soufrés Sulfates
— Plages granuleuses	—	— (grains +)	—	—					—		
3e catégorie	—	—	—	+++	+++	++	—	++	+	—	Sulfates et mucopolysaccharides acides
	- -	-	+++	—	—	—			++	+	Protides soufrés Sulfates

En conclusion, l'injection de radiosulfate à des *Tettigoniidae* de l'espèce *Tettigonia viridissima* est suivie d'une incorporation notable d'atomes de soufre dans des protides soufrés. La radio-activité qui a pour origine ces composés, et qui est celle qu'on observe sur les histo-autoradiographies de coupes méthylées, est toujours plus faible que celle des composés protidiques des divers organes des grillons; ce résultat est en accord avec les données biochimiques. Mais la radio-activité *totale* des histo-autoradiographies est très importante dans les sécrétions glandulaires. Par suite des mélanges de mucopolysaccharides, on peut difficilement apprécier la quantité d'ions SO_4 portés par ces composés. La plupart des atomes de —^{35}S éliminés par l'alcool méthylique à 60 °C doivent surtout avoir pour origine, comme chez les grillons, des ions sulfate libres.

γ) *Quelques données histo-autoradiographiques sur les Conocephalidae.*

Par suite de leur petite taille, les *Conocephalidae* de la faune française (*Conocephalus fuscus*) constituent un matériel peu favorable à des recherches biochimiques qui permettraient une comparaison valable avec les autres Orthoptères étudiés ici. Pour la même raison, la localisation histologique des isotopes est peu précise : le trajet des électrons émis par

le —^{35}S est trop important par rapport à l'épaisseur des couches de tissus ou au diamètre des éléments figurés des sécrétions.

Les observations que j'ai pu effectuer sur des mâles injectés au radiosulfate de sodium, sont en faveur d'une conversion du soufre minéral en soufre organique. Des protides sulfhydrilés deviennent radio-actifs, quoique faiblement, dans les sécrétions des glandes annexes de l'appareil génital mâle, sécrétions qui rappellent beaucoup, par leurs aspects morphologiques et leurs caractères histochimiques, les sécrétions des *Tettigoniidae*. Comme chez ceux-ci, la conversion du soufre minéral en soufre organique doit être beaucoup plus faible que chez les grillons.

En conclusion, si l'on est en droit d'étendre à l'ensemble du vaste groupe des *Tettigonioidea* les résultats obtenus pour trois espèces, on peut reconnaître dans ce groupe d'Orthoptères une possibilité de conversion des sulfates en composés organiques, bien que la quantité des atomes de soufre ainsi convertis ne soit pas très élevée.

c) Espèces à segment bactérien partiellement ou totalement défauné.

La destinée du soufre provenant du radiosulfate peut être envisagée à la fois chez les grillons traités aux antibiotiques et chez les grillons aseptiques. Nous avons vu précédemment que l'addition d'antibiotiques au régime alimentaire provoquait une diminution plus ou moins importante de la flore intestinale, mais jamais une suppression totale; celle-ci ne peut être réalisée que par la méthode des élevages aseptiques.

α) Gryllus bimaculatus traités aux antibiotiques.

La recherche d'amino-acides soufrés a été effectuée, par chromatographie, d'abord sur des broyats de jeunes imagos traités, dès le stade protonymphe, par un mélange de tétracycline, de terramycine et d'auréomycine. Dans ces conditions, après injection de radiosulfate, le système cytéine-cystine, ainsi que la méthionine, sont révélés sous forme de spots radio-actifs très faibles. L'expérience a été effectuée également sur des grillons ingérant, dès l'éclosion, l'un des divers antibiotiques suivants : terramycine, tétracycline, érythromycine, tifomycine. La flore est alors réduite dans des proportions déjà décrites précédemment (chapitre relatif à la sensibilité des germes aux antibiotiques). Après injection de 50 μ C de radiosulfate par g d'Insecte, et chromatographie des broyats hydrolysés, des taches radio-actives, d'intensité notable, existent au niveau des amino-acides soufrés, dans le cas des grillons traités à la tifomycine. Les taches sont beaucoup plus faibles après traitement par la tétracycline ou la terramycine, et absentes de la plupart des chromatogrammes des grillons ayant ingéré l'érythromycine.

Les histo-autoradiographies font apparaître une incorporation normale du soufre dans les mucopolysaccharides du tissu conjonctif, au moins chez les grillons injectés à un stade convenable. De plus, tous les organes riches en protides sulfhydrilés contiennent des atomes de —^{35}S résistant à

la méthylation à 60 °C, le maximum de radio-activité étant obtenu pour les Insectes traités à la tifomycine. Pour tous les individus injectés, on constate qu'une importante fixation de l'isotope a lieu dans l'iléon, au niveau des foyers bactériens qui sont bien développés chez les grillons les moins bien défaunés (grillons traités à la tifomycine) (pl. 10, fig. 3 à 7).

Ainsi, la conversion du soufre minéral en soufre organique n'est pas supprimée par le traitement aux antibiotiques. Ce mécanisme est particulièrement bien conservé quand l'antibiotique utilisé est la tifomycine.

β) *Gryllus bimaculatus. Insectes aseptiques* (*axéniques*).

Sur les radiochromatogrammes de grillons aseptiques injectés, au stade imaginal, au radiosulfate, il n'existe aucun spot radio-actif dans les hydrolysats des tissus, sauf si l'élimination des ions SO_4 n'a pas été réalisée; dans ces conditions, un spot très intense correspond à ceux-ci. Comme chez les grillons partiellement défaunés, ces ions se fixent normalement dans le tissu conjonctif, ainsi que dans les sécrétions des tubes glandulaires annexes mâles. Mais les tissus ou sécrétions riches en groupements — SH ne contiennent plus d'atomes radio-actifs résistant à la méthylation. Tout au plus observe-t-on, dans certains épithéliums, une émission radioactive à peine supérieure au « bruit de fond ».

Chez les grillons aseptiques, le soufre minéral incorporé dans l'organisme persiste donc sous sa forme minérale.

d) Espèces dépourvues de segment bactérien et défaunées.

Chez les espèces dépourvues de segment bactérien, il existe néanmoins des bactéries intestinales. On doit donc envisager la fixation du radiosulfate chez des individus défaunés. L'expérience a été réalisée chez *Locusta migratoria* mais seulement sur des Insectes ayant ingéré un mélange d'antibiotiques incorporés au son de leur nourriture; pour cette espèce, en effet, je n'ai pu réaliser des individus aseptiques par la méthode précédemment exposée. Il serait, en effet, nécessaire de réaliser au préalable la culture aseptique du végétal consommé par les criquets, culture que je n'ai pas réalisée.

Lorsque les criquets traités aux antibiotiques sont injectés au radiosulfate, les méthodes biochimiques ne révèlent aucun spot radio-actif qui puisse être rapporté à des amino-acides soufrés. Sur coupes histologiques, aucun atome de $-^{35}S$ ne résiste à la méthylation. Le conjonctif et certains tubes glandulaires des annexes mâles, sont marqués normalement.

Chez les Acridiens traités aux antibiotiques, il n'existe donc plus de possibilité de conversion du soufre minéral en soufre organique.

En conclusion, les résultats précédents permettent de discuter de la valeur d'une étude des mucopolysaccharides, basée sur la fixation, à leur niveau, de radiosulfate. Ils permettent de préciser également les possibilités de la technique histo-autoradiographique dans la recherche des voies d'utilisation, par l'organisme, du soufre minéral.

Données biochimiques et autoradiographiques font apparaître d'abord un fait assez inattendu. Il s'agit de la très importante fraction de sulfate qui persiste longtemps après l'injection ou l'ingestion de radiosulfate, notamment dans les sécrétions des glandes annexes mâles. Il est assez inhabituel qu'un précurseur soit conservé aussi longtemps (une semaine) dans l'organisme, et surtout qu'un sulfate résiste aussi bien à la fixation et à l'hydratation des coupes. Chez les Vertébrés, la conservation du « soufre sulfate inorganique » (Bescol-Liversac, 1958) nécessite l'emploi de fixateurs spéciaux (Dziewatkowski, 1951-1952; Verne, Weill, Ceccaldi & de Charpal, 1952), toute hydratation ou élévation de la valeur du pH provoquant une extraction des sulfates (Engfeldt, Engström & Boström, 1954). J'ai constaté que l'hydratation des coupes éliminait effectivement les sulfates, chez les Orthoptères; mais le contact avec l'eau doit être suffisamment prolongé, et ce fait explique la variabilité des résultats histo-autoradiographiques selon les colorations préalablement appliquées aux coupes. Sans doute les sulfates sont-ils adsorbés sur les sécrétions glandulaires, ou peut-être interviennent-ils dans la minéralisation des spermatophores? Quoi qu'il en soit, les résultats apparamment contradictoires entre Vertébrés et Orthoptères ont sans doute pour origine la nature très différente des organes considérés : les sécrétions qui constituent les spermatophores des Orthoptères sont élaborées par des ensembles glandulaires complexes qui peuvent difficilement être comparés aux tissus ou sécrétions étudiés chez les Vertébrés par les mêmes méthodes (tissu conjonctif, cartilage, glandes du tractus digestif, etc.). Si de telles glandes n'avaient pas été examinées ici, il aurait sans doute été possible de formuler des conclusions moins opposées concernant les deux groupes zoologiques.

Une autre différence apparaît, toutefois, entre Orthoptères et Vertébrés, dans la fixation du radiosulfate par les mucopolysaccharides acides. L'émission radio-active à partir de composés donnant les réactions des mucopolysaccharides acides est très fréquente chez les *Acridoidea* et les *Tettigonioidea*, plus rare chez les *Grylloidea*. Cette concordance est cependant insuffisante pour que la localisation de l'isotope dans ces composés soit certaine. L'histochimiste doit, en effet, apporter la preuve de la nature sulfatée de ces polysaccharides, et c'est la réaction métachromatique, précédée d'une méthylation réversible, qui a été appliquée dans ce but, selon le mode opératoire préconisé par Spicer (1960) pour les Rongeurs. Malheureusement, dans le cas des Orthoptères, cette méthode se trouve en défaut, au moins pour un tissu : le conjonctif, qui fixe intensément le radiosulfate, ne contiendrait, selon les résultats de la méthylation réversible, que des polysaccharides carboxylés; pourtant le $-^{35}S$ s'y trouve sous une forme minérale, mais non à l'état de sulfate libre, car il résiste à l'extraction aqueuse prolongée. On doit donc admettre que le tissu conjonctif des Orthoptères contient un mélange de polysaccharides sulfatés et de polysaccharides carboxylés. Il en résulte que les résultats de cette méthode doivent être également remis en question à propos des sécrétions des glandes annexes mâles, si riches en mucopolysaccharides

métachromatiques. Des sulfates libres existent effectivement dans ces sécrétions, et ils accompagnent souvent les protides. Mais la radio-activité qui se superpose aux composés métachromatiques peut avoir également pour origine des sulfomucopolysaccharides, mélangés aux polysaccharides carboxylés. Evidemment, une confirmation définitive ne sera apportée que par une étude biochimique des polysaccharides des Insectes. Actuellement, d'après les résultats obtenus ici, on peut penser que la formation de l'acide méthylsulfurique, dans les conditions de la méthylation réversible (4 h à 37 °C) est réalisée à une température beaucoup plus basse que chez les Vertébrés; elle se produirait dans les mêmes conditions techniques que la décarboxylation. Il est donc difficile d'appliquer sans réserves aux Insectes des méthodes mises au point pour les Vertébrés. Chez les Orthoptères, le fait que le mucopolysaccharides soient souvent associés à des protides soufrés ne facilite pas non plus l'identification du groupement anionique par l'emploi des isotopes du soufre. Malgré ces restrictions, la méthode de la méthylation réversible reste très précieuse pour l'identification des carboxyles. Mais c'est surtout la technique d'élimination d3s groupements $O\text{-}SO_3H$ par l'alcool méthylique à 60 °C en présence d'HCl, qui apparaît comme un excellent moyen, non encore utilisé à ce jour en histochimie, pour déceler, de façon sélective, le soufre engagé dans les protides, et pour préciser sa localisation dans les tissus ou sécrétions.

La conversion du soufre minéral en soufre organique, démontrée à la fois par cette méthode et par la biochimie, s'effectue selon des modalités différentes chez les *Grylloidea*, les *Tettigonioidea* et les *Acridoidea*. L'analyse chromatographique montre que la conversion est très importante chez les *Grylloidea*, faible chez les *Tettigonioidea*, presque nulle chez les *Acridoidea*. Dans le premier groupe, les atomes de soufre d'origine minérale se répartissent, après réduction des sulfates, entre les amino-acides libres et ceux qui sont engagés dans les protides, ces derniers en fixant nettement la plus grande partie. Dans les deux autres groupes, la faible quantité d'atomes de soufre organique d'origine minérale, ne permet pas de faire une telle distinction. Il apparaît donc que les *Grylloidea*, comme les *Blattodea*, peuvent utiliser les sulfates pour la synthèse de certains de leurs acides aminés indispensables. Comme chez les blattes, des composés organiques autres que la cystine et la méthionine peuvent également porter des atomes de $—^{35}S$, et ils doivent représenter des composés intermédiaires (cystathionine...), des produits de la dégradation des protides soufrés (acide cystéine sulfinique, taurine...) ou encore des substances inconnues, dont l'une au moins a son équivalent chez les blattes (« unknown 1 », Henry & Block, 1960). Leur identification nécessiterait des recherches complémentaires.

Le métabolisme du soufre minéral peut donc être suffisamment complexe pour que l'interprétation des histo-autoradiographies soit moins simple qu'on a voulu le croire, aussi bien chez les Vertébrés que chez les Insectes. On ne peut ainsi admettre que la détection d'une émission radio-active consécutive à une injection de $Na_2{}^{35}SO_4$ traduise unique-

ment la présence d'atomes de soufre dans les protides (Henry & Block, 1960, *Blatella*) même quand l'isotope est « incorporé à des structures organiques complexes » (Fuzeau-Braesch, 1963, *Gryllus*) pouvant, par ailleurs, incorporer la radiométhionine (cf. les sections glandulaires de deuxième catégorie — *Locusta*). Une attitude opposée a fait admettre par les histochimistes orientés vers l'étude des Vertébrés le « postulat de non-réduction de l'ion sulfate » (Bescol-Liversac, 1958), et cette attitude résulte de considérations antérieures à l'application des isotopes aux recherches biochimiques sur le métabolisme du soufre (Fromageot, 1947), et ne tient pas compte des premières données obtenues par la mise en œuvre du —^{35}S (Dziewiatkowsky, 1946; Engfeldt, Engström & Boström, 1954, Gothié, 1955; Dziewiatkowsky, 1954; Chapeville & Fromageot, 1957). Pour les histochimistes, toute radioactivité produite par le radiosulfate représente une incorporation du —^{35}S dans les sulfomucopolysaccharides, même dans les cas où l'émission radio-active coïncide avec des structures dépourvues de mucopolysaccharides histochimiquement décelables, ou lorsque la méthode appliquée à leur détection manque totalement de spécificité (acide periodique-Schiff). Les observations que j'ai effectuées sur divers Orthoptères démontrent qu'il n'est pas possible d'adopter l'une ou l'autre de ces deux attitudes extrêmes. Sur les pièces où un traitement histologique a fait disparaître les lipides, trois types de composés soufrés sont accessibles à la détection histo-autoradiographique : les sulfates, les sulfomucopolysaccharides, les protides soufrés. Mais les modalités d'incorporation du radiosulfate étant conditionnées par les particularités du métabolisme des espèces envisagées, une voie d'utilisation des sulfates peut être importante dans une espèce, mineure dans une autre; il en résulte que les résultats histo-autoradiographiques peuvent différer selon les Insectes envisagés. L'histochimie est ici conditionnée par la nutrition, et l'interprétation des autoradiographies, pour des espèces dont la physiologie est mal connue, n'en est que plus malaisée. Suivant les espèces, un même tissu, ou des sécrétions homologues, riches en protides soufrés, peuvent être le siège d'une importante incorporation, ou au contraire ne pas capter d'atomes de soufre d'origine minérale : l'étude comparative de la fixation de soufre dans les glandes annexes mâles en fournit de nombreux exemples. Dans certains cas, des tissus, comme le conjonctif, se trouvent marqués sélectivement par le radiosulfate, comme chez les Vertébrés de laboratoire; c'est le cas des Acridiens ou des grillons axéniques. Mais d'autres fois, la radio-activité conférée au conjonctif se trouve confondue avec celle des tissus adjacents, riches en protides soufrés (grillons). Une autre difficulté dans l'interprétation des autoradiographies résulte des mélanges complexes qui existent dans les sécrétions fixant l'isotope. Enfin, signalons que, par suite de la sensibilité presque illimitée de la méthode, les composés organiques soufrés peuvent être révélés, même si la voie qui assure la conversion de l'isotope minéral est quantitativement peu importante (*Locusta*). D'où la nécessité de standardiser la méthode pour des recherches comparatives qui, dépassant le cadre de l'histochimie descriptive, se réclament de l'histophysiologie.

Ces considérations, énoncées à propos des Orthoptères, seraient tout aussi opportunes dans le cas des Vertébrés, où l'on sait, à la suite de recherches biochimiques approfondies (voir à ce sujet les comptes rendus du Colloque sur la Biochimie du Soufre, 1956) que les voies du métabolisme du soufre sont quantitativement très différentes suivant les espèces de Mammifères, et que le postulat de « non-réduction » des sulfates résulte de considérations théoriques, dépourvues de toute base réelle.

C'est à la présence ou à l'absence de bactéries intestinales qu'on a pu rapporter les possibilités très diverses de réduction des sulfates chez les Mammifères (Porc, Rat, Lapin, Ruminants). Pour les Insectes étudiés à ce jour (Dictyoptères), la participation de la flore intestinale à cette conversion, admise au début, a été rejetée (Henry & Block, 1961). Cependant, il n'est pas possible d'écarter une telle hypothèse dans le cas des Orthoptères. En effet, dans cet ordre, la conversion du soufre minéral n'est quantitativement importante que dans le groupe des *Grylloidea*, c'est-à-dire chez les seuls Orthoptères pourvus d'un segment bactérien. Cette voie métabolique est moins importante ou presque absente chez les autres Orthoptères. Elle est réduite par une défaunation partielle des grillons, annulée par défaunation totale. Ces faits conduisent donc à envisager une participation des bactéries de l'iléon à la réduction des sulfates, et à rechercher les *preuves directes* d'une telle intervention bactérienne dans le métabolisme du soufre. Ce problème peut être envisagé par deux méthodes : en premier lieu, par la recherche d'une dégradation des sulfates, *in vitro*, c'est-à-dire par addition du précurseur minéral radio-actif à des cultures des bactéries intestinales des grillons; en second lieu, par la recherche de divers composés organiques soufrés dans l'iléon et dans l'hémolymphe de grillons ayant reçu une injection du même précurseur.

e) Importance des bactéries dans le métabolisme du soufre minéral.

α) *Résultats de l'incorporation de précurseur aux cultures bactériennes.*

Dans le cas des Ruminants, la formation de méthionine et de cystine à partir de sulfate a déjà été recherchée par la méthode des cultures bactériennes (Emery & coll., 1956; Pearson, 1956). Chez les Insectes, cette méthode n'a été appliquée qu'à la mise en évidence des synthèses de vitamines (Blewett & Fraenkel, 1943-1944; Geigy, Hoeff & Kocher, 1954) ou d'amino-acides (Fink, 1952; Hellmuth, 1956), ainsi qu'à l'étude de la dégradation de certains déchets du métabolisme (Toth, 1952) par les micro-organismes associés. Ici, ce sont les transformations subies *in vitro*, par les précurseurs radio-actifs, lorsqu'ils se trouvent en présence des bactéries intestinales, qui vont être étudiées.

Deux modes opératoires ont été mis en œuvre. Dans une première série d'expériences, un prélèvement de la suspension bactérienne du segment à villosités est mis en culture dans du bouillon nutritif contenant le précurseur ($Na_2{}^{35}SO_4$). Cette méthode, qui rappelle celle utilisée par Toth pour prouver la dégradation de l'urée par la flore

intestinale du termite, présente l'inconvénient d'introduire dans le milieu de culture des substances indéterminées qui existent dans la suspension bactérienne de l'intestin. Il m'a semblé préférable, par la suite d'effectuer, l'opération en deux temps : un prélèvement d'une infime partie de la suspension bactérienne est d'abord déposé sur gélose nutritive; puis, après quelques jours, le bouillon contenant le précurseur radio-actif est ensemencé à partir des colonies développées sur la gélose; dans ces conditions, la culture ne contient plus que des bactéries.

Deux jours, quatre jours, sept jours et deux semaines après le début de l'expérience, le bouillon nutritif est centrifugé. Le surnageant est additionné de quelques gouttes d'une solution de N-éthylmaléimide, puis évaporé. Le résidu est repris par l'isopropanol à 10 % et soumis à l'analyse chromatographique. Les chromatogrammes sont mis en contact avec l'émulsion Kodirex, et développés quatre jours, deux semaines ou un mois plus tard.

Qualitativement, les deux modes opératoires ont donné des résultats identiques. Les composés recherchés dans le milieu sont moins abondants quand l'analyse est réalisée à partir des colonies développées sur gélose. Les images radiographiques sont, au contraire, plus intenses lorsque la suspension bactérienne prélevée dans l'iléon, est mise directement en culture dans le milieu sulfaté, ce qui est dû, sans doute, à une concentration microbienne plus élevée.

Deux jours après le début de l'expérience, des composés radio-actifs différant du radiosulfate sont décelables dans la culture. La concentration de ces composés s'accroît ensuite, et, sept jours plus tard, les composés radio-actifs suivants peuvent être révélés :

Systèmes de solvants	Rf des composés radio-actifs apparus dans les cultures	Rf des composés radio-actifs des tubes témoins (sans bactéries)
1	(0,02); *0,10*; 0,25; **0,42**	0,02 (sulfate)
2	(0 à 0,40); *0,60*; **0,80**	0 à 0,40 —
3	(*0,02*); 0,15; **0,25**	0,02 —
4	(0,04); *0,12*; 0,30; **0,48**	0,04 —
5	(0,10); *0,18*; **0,60**; 0,65	0,10
6	(*0,14*); 0,40; 0,50; **0,83**	0,14

Tous les spots radio-actifs, à l'exception de ceux qui correspondent au sulfate et qui sont indiqués entre parenthèses dans la colonne des tubes expérimentaux, correspondent à des composés donnant une réaction positive à la ninhydrine. On exclut l'hypothèse d'un échange isotopique entre les atomes de soufre du précurseur et ceux des substances naturelles du milieu de culture, car dans les tubes témoins, contenant le précurseur mais non les germes, aucun spot radio-actif différant du sulfate n'apparaît. Certains de ces composés n'ont pas été identifiés; leurs spots apparaissent souvent assez mal sur les radiochromatogrammes, sans doute par suite d'une position souvent trop proche du sulfate, dont la tache est parfois très longue (système 2). Sur tous les chromatogrammes, deux spots

radio-actifs apparaissent constamment : l'un provient de la méthionine (caractères gras); l'autre (en italique) de la cystine ou peut-être de la méthionine-sulfoxyde, car elle occupe une position intermédiaire entre celle de ces deux composés soufrés, très proches l'un de l'autre pour les systèmes de solvants utilisés. Aucune hydrolyse n'ayant été pratiquée pour la préparation des échantillons à analyser, ces composés organiques soufrés existent à l'état libre dans le milieu de culture.

Ainsi, les bactéries de la flore de l'iléon interviennent dans la conversion du soufre minéral en soufre organique. On peut envisager que, dans l'iléon de l'hôte comme dans les cultures de bactéries, des composés organiques soufrés soient également libérés. Ce point doit être étudié par l'analyse de la suspension bactérienne, *in situ*, chez les grillons injectés au radio-sulfate. Cette analyse doit également apporter des informations concernant l'utilisation, par les germes eux-mêmes, des composés qu'ils synthétisent aux dépens des sulfates.

β) *Données tirées de l'analyse de la flore intestinale*, in vitro, *chez les grillons injectés au radio-sulfate.*

La suspension bactérienne de l'iléon constitue un lieu privilégié où le sulfate ingéré ou injecté va se fixer avec une très grande intensité et une grande rapidité (moins de 15 mn après l'injection, pl. 13, fig. 8 et 9). Dans le cas d'une injection, c'est par la paroi de l'intestin moyen (segment lisse) que l'isotope gagne la lumière intestinale.

La suspension bactérienne de l'iléon est prélevée 24, 48 et 72 h après l'injection. Elle est centrifugée, et la radio-activité du surnageant est mesurée au compteur, en même temps que celle du culot bactérien préalablement lavé à l'eau physiologique.

Les deux fractions sont intensément radio-actives 24 h après l'injection.

La détermination, par chromatographie, des composés radioactifs libres du surnageant pose des problèmes techniques, liés à la très faible quantité de substance qu'il est possible d'obtenir par ponction. Aussi les données dont il sera fait état, risquent-elles d'être incomplètes.

Vingt-quatre heures après l'injection de radiosulfate, le surnageant de la suspension bactérienne, c'est-à-dire le milieu de culture naturel des micro-organismes, contient, en plus des ions sulfate très abondants, les composés radio-actifs suivants, dont certains correspondent à des taches réagissant à la ninhydrine :

Système de solvant	Rf des composés différant du sulfate
1	*0,10*; 0,15; 0,30
2	0,30; *0,55*; 0,78

Le composé marqué *en italique* peut correspondre à la cystine; celui dont la position, dans les deux systèmes, correspond au Rf 0,15/0,30, pourrait représenter le glutathion. Pour le troisième, il s'agit de l'inconnu déjà signalé précédemment.

Il semble donc que l'on puisse parler d'apparition, dans la suspension bactérienne de l'iléon, de composés organiques soufrés libres, le surnageant n'ayant été soumis à aucune hydrolyse. Ces composés ne persistent pas longtemps dans l'iléon; 48 heures après l'injection, ils ne peuvent plus être décelés.

Il y a évidemment deux possibilités quant à l'utilisation de ces composés organiques dont le soufre provient de la réduction des sulfates : ils sont utilisés soit par les bactéries, soit par l'hôte. L'analyse de l'hémolymphe de l'hôte, et la recherche des protides soufrés radio-actifs dans les germes eux-mêmes, après injection de radiosulfate, permettront de trancher entre ces deux hypothèses.

γ) *Données tirées de l'analyse de l'hémolymphe de grillons injectés au radio-sulfate.*

Si des composés radio-actifs soufrés, synthétisés par les bactéries intestinales, sont libérés dans le milieu intérieur de l'hôte, il doit être possible de les déceler par chromatographie de l'hémolymphe, réalisée sans aucun traitement préalable (sinon l'addition de chlorure de baryum, pour certains essais, afin d'éliminer les ions sulfate). Mais une précision technique doit être prise en considération auparavant.

Lorsqu'un métabolite radio-actif, injecté ou ingéré, pénètre dans le milieu intérieur d'un grillon, il subit le sort de tout précurseur et doit être incorporé à des édifices moléculaires plus complexes. Dans les quelques heures, voire dans les quelques minutes qui suivent l'injection, une partie du précurseur entre dans les chaînes de réactions qui l'incorporent, le reste est excrété. Dans ces conditions, l'analyse de l'hémolymphe, pratiquée 24 h après l'administration du précurseur, ne permet plus de le déceler. Le fait peut être vérifié après injection de méthionine—^{35}S, ou ingestion d'urée—^{14}C : une journée après la pénétration de l'isotope dans l'organisme, la radio-activité du précurseur n'apparaît plus sur les radiochromatogrammes d'hémolymphe. Pour le premier de ces deux isotopes, de plus, la sensibilité de la méthode (une goutte seulement d'hémolymphe est prélevée) ne permet pas la mise en évidence des produits de la dégradation des protides soufrés (taurine, hypotaurine, acide cystéine-sulfinique, sulfate...).

Lorsque le précurseur administré est du radiosulfate, 24 heures plus tard, les radiochromatogrammes sont marqués en quatre points. Un spot de très forte intensité correspond au sulfate; les trois autres ont les positions suivantes :

Système 1	*0,10*;	0,15;	**0,30**
Système 2	*0,55*;	0,68;	**0,76**

On voit donc que certains des composés radio-actifs libres qui circulent dans l'hémolymphe sont les mêmes que ceux qui existent, à l'état libre

également, dans les glandes annexes mâles et dans la suspension bactérienne de l'iléon, ou que ceux dont on voit la synthèse par les cultures bactériennes. C'est le cas de la cystine (*en italique*), et du composé inconnu (en *caractères gras*). Au cours du 2e jour, ces composés disparaissent de l'hémolymphe, et ce fait est à rapprocher de la disparition dans les mêmes délais, des amino-acides libres des glandes annexes de l'appareil génital mâle.

En résumé, l'administration de sulfate de sodium radio-actif à des grillons est suivie d'une apparition, dans le milieu intérieur de l'hôte, de composés organiques radio-actifs identiques à ceux qui sont synthétisés par les bactéries intestinales. Le fait que ces composés, comme le précurseur, persistent pendant 1 ou 2 jours dans l'hémolymphe, indique qu'ils doivent être cédés à l'hôte de façon progressive et continue, au fur et à mesure de la dégradation des ions sulfate retenus dans l'iléon. Compte tenu des précisions techniques relatées précédemment, et du fait que ces composés disparaissent 48 h après l'injection du précurseur, on doit rejeter l'hypothèse selon laquelle ces composés pourraient représenter des produits de la dégradation des protides soufrés.

δ) *Les composés soufrés utilisés par les micro-organismes.*

Pour la recherche d'une éventuelle utilisation des composés organiques synthétisés à partir des sulfates, par les germes eux-mêmes, des résultats sont apportés par les méthodes histo-autoradiographiques et par les techniques chromatographiques.

L'injection de radiosulfate à des grillons est suivie d'un marquage rapide de la suspension bactérienne, marquage qui persiste plusieurs jours, et même plusieurs semaines chez l'imago, alors que toute radio-activité qui puisse être rapportée à des composés libres a disparu depuis longtemps (pl. 13, fig. 6 et 7). On doit donc envisager une incorporation des atomes de soufre dans les bactéries mêmes. Dans quelles combinaisons chimiques se trouvent engagés ces atomes de —^{35}S? Deux possibilités sont à considérer. D'une part, les coques bactériennes sont constituées de mucopolysaccharides acides dont les groupements anioniques ne sont pas de nature carboxylée, mais peuvent être des sulfates ou des phosphates, la distinction entre ces deux groupements étant difficile par les méthodes de l'histochimie. Des ions sulfate provenant du présurseur peuvent donc être incorporés dans ces coques. Cette hypothèse est en accord avec l'importante baisse de radio-activité obtenue par méthylation à 60 °C, baisse de radio-activité qui correspond peut-être à une désulfatation des coques. D'autre part, les bactéries conti3nnent des prodides soufrés, dont certains d'entre eux, les protides sulfhydrilés, sont révélés par les techniques histochimiques. Des atomes de —^{35}S peuvent donc y être engagés. Cette suppitosion est confirmée par le fait que la méthylation laisse persister une importante radio-activité dans la suspension bactérienne de grillons injectés au radio-sulfate.

D'autres arguments sont également apportés par l'analyse chromatographique de culots bactériens débarrassés, par des lavages répétés, de toute trace du milieu de culture naturel dans lequel vivent les micro-organismes de l'iléon. Ici encore, la faible quantité de matériel disponible limite les possibilités de la méthode. Néanmoins, dans les hydrolysats de bactéries provenant de grillons injectés au radio-sulfate, j'ai pu mettre en évidence des composés radio-actifs différant du sulfate, et dont les Rf sont les suivants :

Systèmes de solvants	Rf
1	0,04; 0,06; *0,13*
2	*0,56*; 0,63
3	0; *0,20*
4	0; 0,12; *0,25*; 0,50
5	0,12; 0,60
6	0,06; *0,38*

Légendes de la planche

PLANCHE XIII

Incorporation du soufre minéral radio-actif chez un Acridien (fig. 1 et 2) et chez un Grillon.

Fig. 1 et 2, Segment proximal de tubes glandulaires des annexes mâles, chez un *Schistocerca gregaria* injecté au radiosulfate à la mue imaginale.
1 : Carnoy-autoradiographie, 100 diamètres.
2 : Feulgen-picro-indigocarmin, 100 diamètres.
Remarquer l'incorporation maximum au niveau de la lame anhsite (L), plus faible dans la musculature (M).

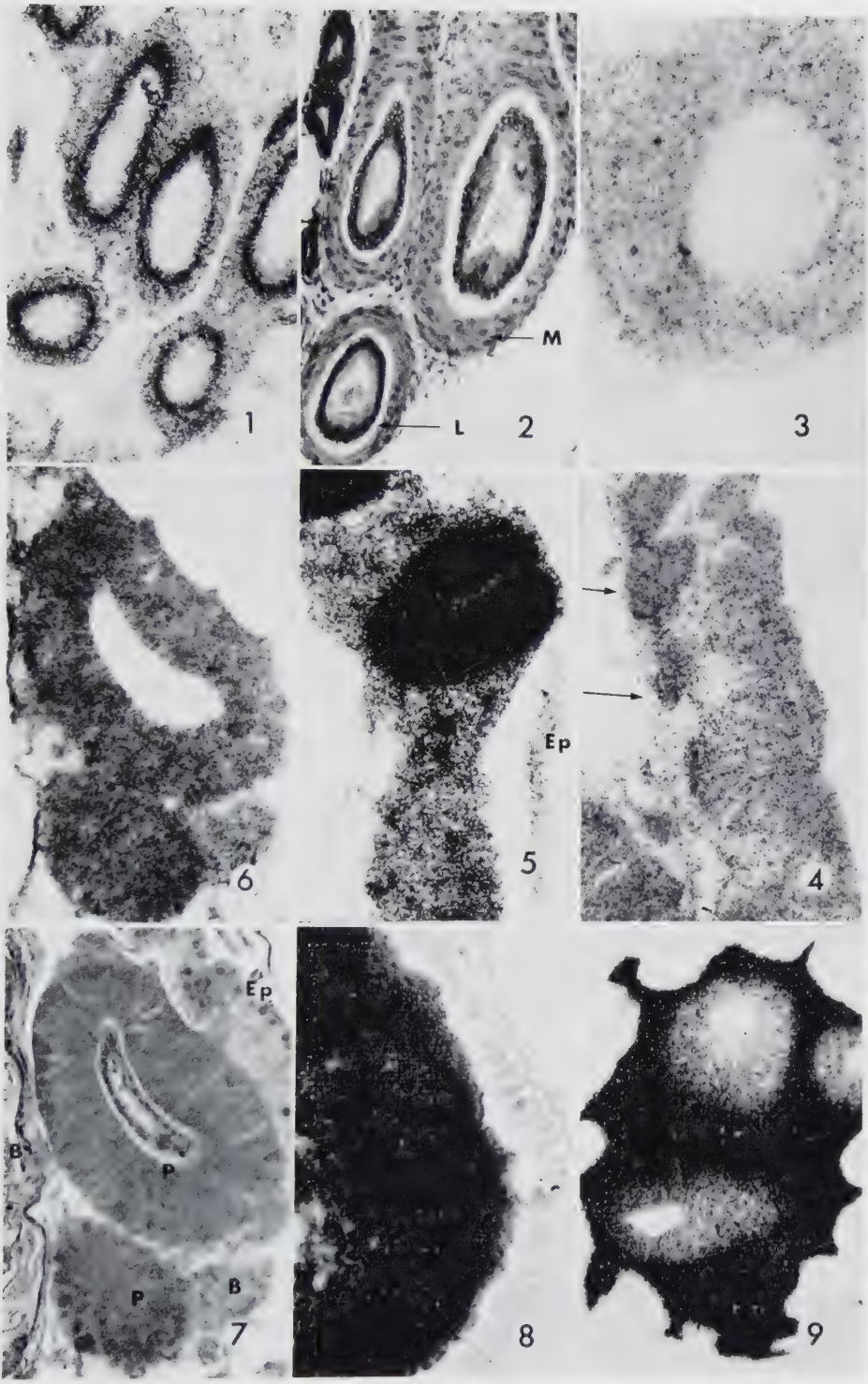
Fig. 3, Epithélium d'un tube glandulaire des annexes mâles, chez un Grillon injecté depuis 5 jours au radiosulfate. (Carnoy-méthylation 3 h à 60 °C, autoradiographie, 600 diamètres). Radio-activité résiduelle due aux protides soufrés.

Fig. 4, Même animal, épithélium du mésentéron (Carnoy-méthylation 3 h à 60 °C, autoradiographie, 130 diamètres). Radio-activité due aux protides soufrés des cellules épithéliales; le tissu conjonctif (flèche) a perdu ses atomes radio-actifs.

Fig. 5, Coupe d'iléon de Grillon injecté depuis 7 jours au radiosulfate (Carnoy-bleu alcian-rouge solide-autoradiographie, 150 diamètres). Noter la radio-activité beaucoup plus importante au niveau de la papille. Ep : épithélium de l'iléon.

Fig. 6 et 7, Même animal que précédemment :
6 : Carnoy-méthylation 3 h à 60 °C, autoradiographie, 180 diamètres;
7 : Trichrome en un temps.
En 6, le traitement par l'alcool méthylique met en évidence les atomes de ^{35}S engagés dans les protéines des bactéries. Comparer avec la coupe voisine 7, qui montre l'emplacement de l'épithélium de l'iléon (Ep), du bol alimentaire (B), des papilles (P) et des bactéries situées en dehors des papilles (B).

Fig. 8 et 9, Coupes d'iléon de Grillon injecté depuis 15 mn au radiosulfate (Carnoy refroidi à — 40 °C, autobiographie, 200 et 60 diamètres). Noter la très grande quantité d'atomes de 35 S dans l'espace à bactéries, moins importante dans les papilles. Nb. Aucune coloration n'ayant été appliquée à ces coupes, les parties noires correspondent *uniquement* aux grains d'argent impressionnés par les électrons du ^{35}S.


1
M
L
2
3
6
Ep
5
4
Ep
B
P
P
B
7
8
9

Une seule tache est constante pour tous les solvants; elle est inscrite en *italique*, et elle correspond à la cystéine, dont on a signalé précédemment la facilité de détection histochimique sur les frottis. Peut-être une autre correspond-elle à la méthionine (même position que la cystéine pour le système 3; 0,50 pour le système 4; 0,60 pour le système 5).

Malgré le caractère très incomplet de ces résultats, les données biochimiques, tout comme les données histo-autoradiographiques, démontrent que certains précurseurs ingérés par l'hôte sont utilisés en partie

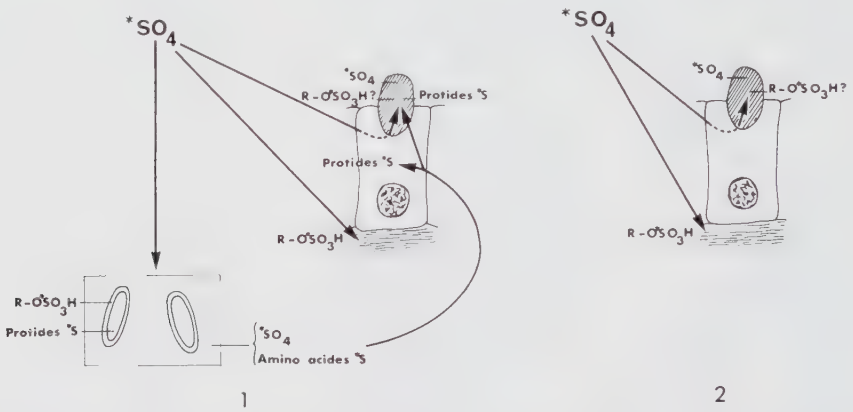


Fig. 9, Schéma résumant la destinée du soufre d'origine minérale, 1° chez un *Grylloidea*; 2° chez un *Acridoidea*.
La suspension bactérienne est figurée par un rectangle contenant deux corps bactériens.

par les micro-organismes intestinaux, pour la synthèse de leurs propres constituants. Cet aspect des rapports entre bactéries et hôte, aspect qui traduit un certain degré de parasitisme des germes, trouve d'ailleurs une confirmation dans le fait que ces germes puisent dans le milieu intérieur du Grillon d'autres métabolites. Ainsi, lorsque de la méthionine radioactive est injectée à l'hôte, de la cystine marquée existe dans les hydrolysats de bactéries 24 ou 48 h plus tard, alors que l'isotope initial n'existe plus, à l'état libre, dans le milieu de culture naturel des germes ou dans le milieu intérieur du Grillon. Il en est de même pour la cystéine qui, présentée à l'hôte sous forme de chlorhydrate radio-actif, marque intensément les germes. Sans doute ces amino-acides sont-ils utilisés par les bactéries dans les mêmes délais qu'ils le sont par l'hôte, c'est-à-dire dans les quelques instants qui suivent leur pénétration dans la suspension bactérienne et dans le milieu intérieur du Grillon.

En conclusion, les bactéries intestinales des grillons sont capables de réduire les sulfates, permettant ainsi une conversion du soufre minéral en soufre organique. Une partie des composés organiques synthétisés est utilisée par les germes, une autre est libérée dans le milieu intérieur de l'hôte.

2. Conversion de la cystéine en méthionine.

On sait que dans les organismes supérieurs, la méthionine est un précurseur de la cystéine et de la cystine. Une telle réaction a été mise en évidence pour plusieurs espèces d'Insectes (*Blatella*, *Musca*, *Phormia*), bien que tous les intermédiaires n'aient pas encore été identifiés.

Mais le mécanisme de transsulfuration inverse, qui conduit de la cystéine à la méthionine, exige la participation de micro-organismes, qui, seuls, sont capables de scinder la cystathionine d'un côté ou de l'autre de l'atome de soufre :

$$\text{Cystéine} \rightarrow S\begin{matrix}<\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CHNH}_2\text{-COOH} \\ \text{CH}_2\text{-CHNH}_2\text{-COOH}\end{matrix} \rightarrow \text{H-S-CH}_2\text{-CHNH}_2\text{-COOH} \rightarrow \text{Méthionine}$$

L'embryon de Poulet est le seul organisme supérieur actuellement connu qui soit également capable d'effectuer une telle transformation (Pearson, 1956). Une telle réaction a été démontrée chez les blattes (Block & Henry, 1961), où elle est produite par les bactéroïdes intracellulaires. Il était donc possible d'envisager l'existence de cette voie métabolique chez les Orthoptères pourvus d'un segment bactérien, bien que la nature des germes mis en jeu soit nécessairement différente chez les Dictyoptères et chez les *Grylloidea*, puisqu'il n'existe pas de formes intracellulaires chez ces derniers.

Une telle recherche ne peut être abordée que par les méthodes de la biochimie. L'ingestion de cystéine radio-active, sous forme de chlorhydrate, est en effet suivie d'une incorporation d'atomes de ^{35}S aux protides soufrés de l'hôte, que ce précurseur soit ou non transformé en méthionine. Or, les méthodes histochimiques sont impuissantes à effectuer la distinction entre méthionine et cystine ou cystéine, si bien que l'émission radio-active ne peut, sur coupes histologiques, être rapportée à l'un ou l'autre de ces composés.

Le mode opératoire utilisé ici est le suivant : du chlorhydrate de cystéine-^{35}S est présenté à des lots de 5 imagos, à raison de 50 μC par g d'animal. Trois jours plus tard, le tube digestif est enlevé, et, sur le reste du corps, les amino-acides soufrés sont recherchés de la même façon qu'après injection de radiosulfate, mais sans qu'une élimination d'ions SO_4 soit réalisée après l'hydrolyse.

a) Résultats.

L'expérience est réalisée sur des grillons normaux, sur des grillons aseptiques, et sur un Acridoidea (*Locusta migratoria*).

α) Gryllus bimaculatus. Insectes xéniques.

Sur tous les radiochromatogrammes, le spot radio-actif le plus intense correspond à la cystine. Parfois, un autre spot, qui correspond soit à la cystéine, soit à la taurine, est également radio-actif. Mais une tache, de radio-activité plus faible, existe toujours et sa position est celle de la méthionine. Aucun autre élément radio-actif ne peut être décelé dans les conditions techniques de l'expérience où la durée d'exposition du chromatogramme sur l'émulsion sensible est court (2 semaines).

β) *Gryllus bimaculatus. Insectes aseptiques.*

Seul un spot dont la position est celle de la cystine est intensément radio-actif. Aucune radio-activité n'existe à un niveau proche de celui de la méthionine.

γ) *Locusta migratoria.*

Les résultats sont tout à fait comparables à ceux qui sont obtenus avec les grillons aseptiques.

En *conclusion*, seules les espèces d'Orthoptères possédant un segment intestinal peuvent convertir la cystéine en méthionine. Cette transsulfuration étant abolie par suppression de la flore intestinale, l'hypothèse d'une participation effective des germes peut être avancée. Il convient, toutefois, d'en donner une preuve directe, en cherchant à reproduire ce mécanisme *in vitro*.

b) Importance des bactéries dans la conversion de la cystéine en méthionine. Résultat de l'addition du précurseur aux cultures bactériennes.

L'expérience est réalisée de la même façon que pour le radiosulfate de sodium.

Ici, les bactéries mises en culture peuvent disposer à la fois de cystéine et de cystine radio-actives. L'analyse chromatographique d'une solution témoin de bouillon nutritif, dépourvue de bactéries mais contenant le précurseur (chlorhydrate de cystéine—^{35}S), révèle que ce dernier se transforme spontanément en cystine, processus qui est bien connu des biochimistes. Deux semaines après l'addition du chlorhydrate, le bouillon stérile contient beaucoup plus de cystine que de cystéine. Dans les délais de l'expérience (deux semaines), c'est donc le système cystéine-cystine que les germes peuvent ainsi utiliser. Ce point devait être précisé pour l'interprétation des chromatogrammes.

L'analyse chromatographique révèle l'apparition, dans le surnageant de la culture, de composés radio-actifs différant des amino-acides sulfhydrilés additionnés initialement. Les Rf de ces composés, de même que ceux des précurseurs, sont les suivants :

Systèmes de solvants	Rf cystéine-cystine	Rf composés nouveaux
1	0,05; 0,12	**0,35**
2	0,65; 0,70	**0,80**
5	0,10; 0,15	0,40; **0,60**; 0,76
6	0,15; 0,28	0,45; 0,55; **0,75**

Parmi les composés qui apparaissent dans le milieu de culture, certains n'ont pu être rapportés à des substances facilement déterminables. Mais celui dont la position est indiquée en caractères gras correspond à la méthionine, dont la tache réagit, par ailleurs, à la ninhydrine. L'absence d'hydrolyse au cours des opérations techniques indique que cet

amino-acide n'est pas engagé dans des liaisons protidiques, mais existe à l'état libre.

Ainsi les bactéries intestinales du Grillon, cultivées sur un milieu enrichi en cystéine, libèrent de la méthionine. Sans doute utilisent-elles ce mécanisme pour la synthèse de leur propre méthionine. Mais il est certain que, dans l'iléon comme dans les cultures *in vitro*, de la méthionine puisse être libérée, et qu'ainsi l'hôte puisse en tirer profit.

C. Utilisation de la cellulose.

La présence de micro-organismes intestinaux, chez les Insectes xylophages, a depuis longtemps été associée à la digestion de la cellulose, bien qu'une activité cellulolytique ait quelquefois été envisagée à propos d'espèces pauvres en bactéries (*Xestobium rufovillosum*, *Hylotrupes* sp., etc., (Norman, 1936; Mansour & Mansour-Bek, 1937). Florkin (cité par V. Buddenbrock, 1956) considère que la dégradation de la cellulose, dans un organisme supérieur, ne peut être envisagée qu'avec scepticisme, si l'intervention de la flore intestinale ne peut être envisagée. Cependant, au cours des dernières années, des physiologistes ont adopté une attitude tout à fait opposée. Chez les Ruminants, il n'existerait pas d'activité cellulolytique dans les filtrats de rumen (Kitts & Underkofler, 1954). Les Gastéropodes Pulmonés seraient capables de produire leur propre cellulase (Strasdine & Whitaker, 1963). Alors que les Flagellés des Termites fermentent la cellulose (Hungate, 1943), la dégradation de ce polyoside ne se produit pas dans les cultures des germes intestinaux des Thysanoures, alors qu'elle a lieu chez les Insectes axéniques (Lasker & Giese, 1956). Ainsi, malgré de nombreuses données qui démontrent une dégradation et une utilisation de la cellulose, notamment chez les Isoptères, Dictyoptères ou Lépidoptères (*Cossus*), un désaccord persiste quant à l'origine de l'enzyme. Il en résulte, dans les traités de Physiologie (Wigglesworth, von Buddenbrock, Roeder) des prises de position très diverses.

Pour les Thysanoures (*Ctenolepisma lineata*), les études avaient été menées grâce à l'emploi de cellulose radio-active, marquée au ^{14}-C. J'ai également fait appel à cet isotope pour rechercher une éventuelle utilisation de la cellulose par les Orthoptères. Mais les expériences ne peuvent être réalisées aussi simplement qu'avec les isotopes soufrés. Les difficultés proviennent du grand nombre d'impuretés, radio-actives elles aussi, qui contaminent le produit commercial (*). Celui-ci n'est, en fait, qu'un mélange d'oses, d'amidon, de pectine, d'hémicelluloses et de cellulose, tous radio-actifs. Des purifications successives sont nécessaires. Les oses, l'amidon et les pectines sont éliminées par des lavages répétés à l'eau chaude, les hémicelluloses par extration à la soude. Dans ces conditions, la radio-activité résiduelle, due à la seule cellulose, est faible.

Des fragments aussi semblables que possible de cellulose purifiée, ajoutés à des fragments de salade ou à des germinations de blé, sont présentés à des grillons normaux, à d'autres traités aux antibiotiques, ainsi qu'à des Acridiens (*Locusta*,

(*) California Corporation for Biochemical Research.

Schistocerca), tous adultes. 18 h après le repas, une goutte d'hémolymphe, de volume connu, est introduite sous un compteur de Geiger-Müller à anticoïncidences, pour la mesure de sa radio-activité.

Les résultats démontrent un passage de composés radio-actifs dans l'hémolymphe des grillons. La radio-activité spécifique de l'hémolymphe est plus élevée chez les grillons normaux que chez les grillons partiellement défaunés (Martoja, 1962). Pour les Acridiens, aucune radio-activité n'est décelable. Les données histo-autoradiographiques démontrent une incorporation d'atomes de —^{14}C, dans les glandes annexes mâles des grillons seulement.

Les résultats négatifs obtenus pour les Acridiens n'ont peut-être pas une signification absolue et définitive. Il est possible, étant donnée la faible radio-activité de l'aliment, que la dégradation soit seulement moins importante que chez les grillons, et indécelable dans les conditions techniques de l'expérience. Cependant, il semble bien établi que les espèces à segment bactérien (*Gryllus*) utilisent la cellulose, et ceci d'autant mieux que la flore intestinale est plus importante.

Des recherches complémentaires sont évidemment souhaitables, non seulement pour confirmer que les Acridiens ne possèdent pas de cellulase, mais aussi pour déterminer la nature chimique des produits absorbés par la paroi intestinale (oses, acides gras), chez les grillons nourris à la cellulose. Ces recherches sont conditionnées par l'obtention d'un isotope commercial à la fois pur et de haute activité spécifique.

D. Utilisation de l'urée.

A la suite de recherches classiques (Loosli, Williams, Thomas & Maynard, 1949) qui démontrent que, dans le rumen des Mammifères, des amino-acides sont synthétisés à partir de l'urée, l'éventualité d'une dégradation de l'urée par les bactéries intestinales des Insectes pouvait être envisagée. Chez les Isoptères, Toth (1952) met en évidence la production d'ammoniac dans des cultures de la flore intestinale des Termites, mises en présence d'urée ou d'acide urique. Mais l'utilisation, par l'hôte, des composés azotés libérés ou synthétisés n'est pas démontrée par cette méthode. Bien que les tentatives de mise en évidence d'une uréase chez *Gryllus domesticus*, n'aient donné que des résultats négatifs (Razet, 1961), j'ai cru opportun d'envisager néanmoins l'utilisation de l'urée par les Orthoptères pourvus d'une flore intestinale bien développée (grillons), et éventuellement de comparer les résultats obtenus avec ceux tirés de l'expérimentation sur d'autres Orthoptères.

La méthode que j'ai utilisée fait appel à un isotope marqué au —^{14}C. Dans ce genre d'expériences ce n'est plus le radical azoté qui peut-être suivi, mais les dérivés portant les atomes de carbone. L'urée, dont la pureté isotopique, très grande, est vérifiée au préalable par chromatographie de la solution initiale, est incorporée aux aliments. Des volumes identiques d'isotope (en solution aqueuse) sont déposés sur des fragments de salade. L'échantillon est séché et présenté à des Orthoptères préalablement mis à jeun. Seuls sont retenus les insectes qui ingèrent la totalité de l'échantillon dans les premières minutes de l'expérience.

1. Résultats

a) Espèce à segment bactérien (*Gryllus bimaculatus*).

Une expérience préliminaire est destinée à mettre en évidence l'absorption de l'isotope par la paroi intestinale. A divers moments après l'ingestion (1 h, 2 h, 4 h, 48 h), une goutte d'hémolymphe est prélevée et analysée par radiochromatographie. On constate que, dans les quelques heures qui suivent le repas, une forte radio-activité existe en un seul point, dont la position est celle de l'urée : l'absorption par l'épithélium intestinal a donc bien lieu. Plus tard, l'urée disparaît de l'hémolymphe, et ne donne plus de tache caractéristique, 48 h après l'ingestion.

Les animaux sont fixés par le liquide de Carnoy, entre 3 et 6 jours après l'ingestion de l'isotope, débités en coupes et étudiés par la méthode histo-autoradiographique, l'émulsion sensible étant couchée sur les coupes après coloration de celles-ci. Je rappellerai ici qu'à la suite des essais préliminaires dont il a été question (voir page 71), on doit s'attendre à une impossibilité de détection autographique de l'urée qui pourrait encore exister sous sa forme initiale dans certains tissus. La disparition de l'urée que l'on observe dans l'hémolymphe rend, d'ailleurs, improbable une conservation à longue échéance de ce composé, dans l'organisme. Il s'ensuit que la radio-activité décelée dans les coupes devra avoir pour origine des composés différents de l'isotope initial.

Tous les grillons nourris à l'urée —^{14}C deviennent radio-actifs,et cette radio-activité persiste plus d'une semaine dans les tissus. L'examen des histo-autoradiographies permet de reconnaître une intense émission radio-active dans de nombreux organes. Dans le *corps gras*, ce sont les travées cytoplasmiques qui sont radio-actives. Mais, malgré la présentation de plusieurs repas d'urée à divers moments du cycle d'intermue, aucune radio-activité n'a pu être mise en évidence au niveau des granules de glycogène ou à celui des globules lipidiques (sur coupes à la congélation de pièces formolées). Tous les *œnocytes* sont le siège d'une forte radio-activité. La taille élevée de ces cellules permet de compenser l'absence de précision dans la localisation de l'origine des électrons, et de rapporter le siège de la radio-activité au seul cytoplasme. Toutes les *fibres musculaires*, qu'il s'agisse des musculeuses bordant les conduits génitaux et digestifs, ou des muscles moteurs, sont radioactives. Les *glandes génitales mâles* fixent bien l'isotope. Tous les types de cellules germinales peuvent être radio-actifs; mais, chez l'imago, une grande partie des spermatozoïdes ne se marquent pas, vraisemblablement parce qu'ils étaient différenciés avant l'ingestion de l'isotope. Dans les faisceaux des spermatozoïdes radio-actifs, seules les zones cytoplasmiques émettent des électrons. Dans les *glandes génitales femelles*, le cytoplasme des oocytes en interphase de grand accroissement se marque. Dans les oocytes en cours de vitellogenèse, le vitellus, ainsi que le cytoplasme des cellules folliculeuses deviennent radio-actifs, mais assez faiblement. Les *cellules épithéliales* se marquent au niveau de tous les épithélium. Les revêtements cuticulaires sont également radio-actifs (pl. 10, fig. 9) mais donnent des résultats extrêmement variés, selon le moment du cycle de mue où l'Insecte est

mis en contact avec l'isotope : dans certains cas, le tégument ne se marque pas; dans d'autres, seules les couches profondes sont radio-actives; parfois, la cuticule est radio-active dans toute son épaisseur. Dans le *tissu nerveux*, la radio-activité est moins intense que dans les autres organes; cortex et neuropile se marquent également. On obtient une forte radio-activité dans tous les acini des *glandes salivaires;* les cellules qui sont à l'origine des canaux, comme les cellules glandulaires, se marquent de façon égale. Mais, pour ces dernières, il semble que le cytoplasme de la cellule soit plus radio-actif que la sécrétion. Dans les *glandes annexes de l'appareil génital mâle*, l'ingestion d'urée réalise un marquage de l'épithélium de presque tous les tubes, l'intensité la plus forte étant située dans les sécrétions : tous les tubes qui élaborent des protides sécrètent des composés dont la radio-activité dépasse de beaucoup celle décelée dans les autres organes (pl. 10, fig. 8). Il n'est pas possible de rapporter cette radio-activité à un composé ou à un groupe de substances déterminées; ces tubes élaborent tous, en effet, des mélanges complexes de protides. Dans les quelques glandes dont la sécrétion est de nature glucidique (mucopolysaccharides acides), la radio-activité est extrêmement faible ou nulle; étant donné le calibre étroit de ces éléments, il est même possible que les grains d'argent observés au-dessus de la sécrétion aient pour origine l'épithélium de ces tubes. Quoi qu'il en soit, ce sont surtout les sécrétions protidiques qui incorporent le $-^{14}C$.

En conclusion, l'ingestion d'urée par les grillons est suivie d'une apparition de composés radio-actifs dans la plupart des tissus et des sécrétions. Au stade de l'expérience où l'Insecte est fixé, et en raison de la nature du fixateur, une conservation de l'isotope ingéré est impossible; ces composés radio-actifs ne peuvent donc provenir que d'une métabolisation du précurseur. Les atomes radio-actifs apparaissent dans presque tous les tissus et dans des sécrétions. Il semble que seuls les composés protidiques bénéficient de cet apport carboné, puisque ni les lipides, ni le glycogène, ni les mucopolysaccharides acides n'acquièrent de radio-activité.

b) Espèces dépourvues de segment bactérien (*Barbitistes fischeri*, *Locusta migratoria*).

Le protocole expérimental est le même que pour les grillons; l'isotope est déposé sur de la salade pour la Tettigonide, sur une feuille de *Poa* pour l'Acridien. Dans certains cas, plusieurs repas d'urée sont ingérés.

Pour les deux espèces, il n'existe aucune radio-activité dans les tissus, dans les sécrétions ou dans les produits de réserve. Si le couchage de l'émulsion a lieu avant l'hydratation des coupes, on observe souvent une radio-activité diffuse qui semble imprégner les organes; mais le composé radio-actif en cause disparaît instantanément au contact des coupes avec l'eau.

Pour ces deux espèces, il n'existe donc pas de possibilité d'utiliser l'urée.

c) Grillons partiellement défaunés.

Quand les grillons sont partiellement défaunés par la terramycine, la tétracycline, l'auréomycine, ou par un mélange de trois antibiotiques, et qu'ils ingèrent une même quantité d'isotope que les grillons témoins, on observe, selon les cas, une absence totale de radio-activité dans les organes, ou bien une radio-activité légère. Comme pour les espèces dépourvues de segment bactérien, le traitement des coupes sans hydratation met en évidence un composé diffus très hydrosoluble. Mais la quantité d'atomes de —^{14}C métabolisés est faible, voire nulle.

d) Grillons aseptiques.

Des larves ou des imagos, aseptiques, ingèrent, à 2 jours d'intervalle, 2 repas supplémentés à l'urée—^{14}C. Ils sont fixés au Carnoy, 3 jours après la dernière ingestion. Les résultats des histo-autoradiographies sont, ici encore, très différents selon que l'émulsion est couchée avant ou après hydratation des coupes. Pour les coupes hydratées, une exposition prolongée jusqu'à 2 mois ne peut déceler de radio-activité dans les tissus ou dans les sécrétions, alors que chez les grillons xéniques, quelques jours suffisent pour que les atomes de —^{14}C métabolisés soient révélés. Dans le cas où le dépôt de l'émulsion sensible précède l'hydratation des coupes, une importante radio-activité est alors révélée dans les organes. Les composés radio-actifs, très hydrosolubles, tendent même à diffuser dans l'émulsion au cours des quelques minutes qui précèdent son séchage; ils impressionnent ainsi l'émulsion assez loin de la périphérie des coupes.

Les grillons aseptiques sont donc radio-actifs. Mais le ou les substances radio-actives, dont la nature n'a pas été déterminée, ne sont pas intégrés dans les protides de constitution ou dans les sécrétions de l'Insecte, comme c'est le cas pour les grillons normaux. Ces substances semblent imprégner simplement les tissus.

2. Importance des micro-organismes dans l'utilisation de l'urée. Données tirées des cultures bactériennes.

Des résultats précédemment exposés, il apparaît que l'urée ne peut être métabolisée par l'Insecte que dans la mesure où celui-ci héberge une importante flore intestinale. Les données de Toth renforcent l'hypothèse d'une participation des bactéries intestinales à ce phénomène.

C'est par la méthode des cultures bactériennes, en présence de l'isotope, que je me suis proposé de rechercher le rôle des micro-organismes. J'ai opéré d'une part sur un prélèvement global de la suspension bactérienne, mis en culture dans du bouillon nutritif additionné d'urée-^{14}C, d'autre part sur des ensemencements d'un bouillon, à partir de colonies développées sur de la gélose. Les deux modes opératoires ont donné des résultats parallèles, avec une intensité plus forte dans le second cas. Après 2 semaines de contact entre les germes et l'isotope, les cultures sont centrifugées l'urée est éliminée de certains échantillons par le xanthydrol acétique. Après centrifugation, le surnageant est évaporé, le résidu est repris par une goutte d'isopropanol à 10 % et soumis à l'analyse chromatographique.

Les radiographies des chromatogrammes révèlent alors les spots radio-actifs suivants, dont l'intensité est indiquée par des $^{+}$:

Systèmes	Rf de l'urée	Rf des composés nouveaux
1	0,60	*0,22*$^{+}$; *0,34*$^{++}$; 0,42 ; 0,75^{+++}
4	0,50	*0,21*$^{++}$; *0,33*$^{++}$; 0,75^{+}
5	0,45	*0,11*$^{+++}$; 0,20^{+} ; *0,25*$^{++}$
6	0,70	*0,42*$^{+}$; *0,48*$^{+}$; 0,52^{+} ; *0,83*$^{+++}$
propanol 70 %		*0,84*$^{+++}$; *0,90*$^{+}$; *0,96*$^{+}$

Certains des spots (*en italique*), dont la radio-activité est très élevée, correspondent à des taches réagissant avec la ninhydrine. Il peut donc s'agir de sels d'ammonium, d'amino-acides ou encore d'amines aliphatiques primaires ou secondaires, qui réagissent également avec le réactif (Neuberg, 1913; Feigl, 1954). Les autres spots radio-actifs n'ont pu être interprétés, dans le cadre volontairement restreint de ce travail : la recherche des acides gras non volatils ne permet pas d'en déceler à ce niveau; quant aux sucres réducteurs, un seul existe, au niveau d'un spot de très faible intensité (Rf 0,42 dans le système 1). L'identification des composés réagissant à la ninhydrine demandera des recherches biochimiques approfondies. Il est peu probable qu'il s'agisse de sels d'ammonium, aucun dégagement d'ammoniac n'étant obtenu par addition d'une base forte au surnageant bactérien. Il est probable qu'il s'agit d'amino-acides plutôt que d'amines. On sait, en effet, que le traitement par la ninhydrine provoque l'élimination du carboxyle, dans le seul cas où celui-ci existe, c'est-à-dire dans le cas d'un amino-acide :

$$R{-}_{\alpha}CH\begin{matrix}<\text{COOH}\\ \text{NH}_2\end{matrix} \rightarrow R{-}_{\alpha}C\begin{matrix}<\text{O}\\ \text{H}\end{matrix} + NH_3 + CO_2$$

Si les carboxyles portent un atomede —^{14}C, le traitement par ce réactif doit donc provoquer une baisse, voire une disparition totale de la radio-activité si les atomes de la chaîne ne sont pas marqués. Il suffit donc d'effectuer deux mesures de l'activité pour une même tache d'un chromatogramme, l'une avant le traitement par la ninhydrine, l'autre après action de ce réactif. Les mesures ont été effectuées pour les trois taches principales obtenues avec le premier système de solvants. Elles ont donné les résultats suivants :

Rf de la tache	Radio-activité avant traitement par la ninhydrine (coups par mn)	Radio-activité après traitement par la ninhydrine (coups par mn)
0,22	93	70
0,34	152	130
0,75	380	380

Le traitement par la ninhydrine provoque donc une baisse de radio-activité de 15 à 25 % pour les taches qui réagissent de façon positive avec le réactif. Il est sans action sur la radio-activité de l'autre composé. On doit donc penser que certaines des substances synthétisées à partir de l'urée portent un radical carboxyle, indépendamment du groupement amine, et qu'elles représentent donc des amino-acides. Le fait qu'une grande partie de la radio-activité soit conservée malgré la réaction avec la ninhydrine démontre que les atomes de ^{14}C provenant du précurseur existent non seulement dans les carboxyles, mais aussi dans la chaîne.

Malgré le caractère un peu sommaire de ces données, il est ainsi prouvé que les bactéries de l'intestin des grillons peuvent synthétiser, à partir d'urée, des composés organiques dont certains sont des amino-acides, et qui sont libérés dans le milieu de culture. Il est probable que des substances identiques sont libérées dans la culture naturelle que constitue la suspension bactérienne de l'iléon. Grâce aux bactéries, l'urée peut donc constituer pour l'hôte une source de carbone. Mais une partie de l'apport carboné est destiné aux germes eux-mêmes : ceux-ci sont toujours intensément marqués sur les autoradiographies de coupes provenant de grillons nourris à l'urée.

DISCUSSION

Des observations précédemment rapportées, il découle que les germes intestinaux sont répartis de façon inégale dans les différents groupes d'Orthoptères. Chez les *Acridoidea* et les *Tettigonioidea*, aucun segment particulier du tube digestif ne subit de modifications liées au maintien d'une riche flore. Les bactéries intestinales, plus abondantes chez les *Tettigonioidea* que chez les *Acridoidea*, sont libres dans la lumière du tube digestif, et se trouvent, le plus souvent, mêlées aux aliments. Bien qu'il puisse exister, au moins chez les Tettigonioidea, des formes permanentes, il est probable que la plupart de ces germes libres sont d'origine alimentaire. Dans le sous-ordre des Grylloidea, la situation est fort différente. Pour toutes les familles, à l'exception peut-être de celle des *Myrmecophilidae*, un segment défini du proctodeum, l'iléon, subit d'importantes modifications de structure qui sont en rapport, d'une part avec le maintien d'une flore bactérienne exceptionnellement riche, d'autre part avec le rejet des produits de l'excrétion à un niveau inhabituel. La présence de ce segment bactérien accentue encore les différences anatomiques, déjà nombreuses, qui existent entre les *Grylloidea* et les autres groupes d'Orthoptères. Il rapproche, au contraire, les *Grylloidea* des ordres voisins d'Insectes, Dictyoptères, Isoptères, Coléoptères. Si l'on considère que, seules des formes bactériennes extracellulaires existent chez les *Grylloidea*, c'est avec les Isoptères que les analogies sont les plus nettes. Dans les deux groupes, l'étude des relations existant entre l'hôte et sa flore, se trouve facilitée, par l'impossibilité d'une interférence des germes intracellulaires dans les processus physiologiques envisagés.

La flore intestinale des *Grylloidea* présente l'originalité d'être localisée en dehors de la voie excrétrice. C'est le seul exemple connu où un segment bactérien proctodéal est reporté en avant de la région où se déversent les produits d'excrétion. Ce point est sans doute en relation avec le développement exceptionnel de l'appareil excréteur chez les Orthoptères : alors que Coléoptères ou Isoptères ne possèdent qu'un petit nombre de tubes de Malpighi, c'est par centaines qu'il faut compter ces tubes dans le cas des grillons. Cette différence mise à part, la localisation anatomique du segment à villosités des *Grylloidea* est parfois comparable à celle du segment à Flagellés des Isoptères, lorsqu'il est antérieur lui aussi (*), ou à celle du segment bactérien de certains Coléoptères (*Melolontha*). Mais, pour d'autres espèces de Coléoptères à flore associée, la « chambre à fermentations » est reportée à un niveau qui correspondrait, d'après les dessins de Mingazzini (1889) ou de Wiedemann (1930), au côlon. Dans de nombreux cas, la paroi de l'organe à bactéries porte des différenciations en forme de papilles, et ceci, quelle que soit sa position anatomique. La présence de ce sstructures semble donc liée à la fonction de ce segment, qui est de maintenir la flore dans la lumière intestinale, en prévenant une élimination trop importante par le transit du bol alimentaire.

La flore intestinale des *Grylloidea* est permanente. Mise en place dans l'intestin au cours du premier stade larvaire, elle se maintient sans modifications notables tout au long de la vie de l'Insecte, grâce à la persistance des nappes microbiennes dans la partie antérieure de l'iléon, au moment des mues. Les processus observés au cours de la mue, chez les grillons, sont très proches de ceux qui ont été décrits chez les Isoptères ou les Dictyoptères; mais une comparaison n'est guère possible avec les Coléoptères, nos connaissances concernant l'infestation, le maintien des germes et leur devenir au cours de la nymphose étant inexistantes. La flore des grillons ne subit de modifications importantes (sporulation) qu'au cours de la diapause nymphale, et chez certaines espèces seulement. Quant au mode d'infestation des grillons nouveau-nés, il est différent de celui qui existe dans les ordres voisins. Nous ignorons comment se contaminent les Coléoptères, mais nous savons que, chez les Termites,

(*) La signification anatomique du segment à Flagellés des Termites n'apparaît pas toujours clairement à la lecture des mémoires originaux. Il est fait état d'une « panse rectale », l'ensemble du proctodeum étant souvent assimilé au rectum. Noirot & Noirot-Timotée (1960), à propos d'*Anoplotermes*, font précéder le rectum d'une dilatation qui s'intercalerait entre celui-ci et le segment à Flagellés; la dilatation pourrait être le côlon et la panse correspondre à l'iléon. Bacetti (1962), à propos de *Reticulitermes lucifugus*, divise le proctodeum en deux segments seulement, un rectum, précédé d'un côlon, lui-même subdivisé en un « côlon antérieur » et un « côlon postérieur », le côlon antérieur hébergeant les Flagellés. Mes observations sur le tube digestif de cette même espèce me conduisent à reconnaître trois segments dans le proctodeum, et à donner une interprétation différente de celle de Bacetti : le segment antérieur, très dilaté et hébergeant les symbiotes, est l'homologue du segment à villosités des *Grylloidea ;* le segment suivant est plus étroit et correspond au côlon des Orthoptères; le troisième segment est un rectum typique.

L'homologie est encore plus difficile à établir entre les *Grylloidea* et les espèces de la famille des *Termitinae*. Chez ces Termites, la panse est souvent double (Noirot et Kovoor, 1958). Etant toujours située très antérieurement dans le proctodeum, elle représente peut-être l'iléon, au moins chez *Thoracotermes*.

l'infestation est réalisée par des contacts entre les nouveau-nés et des individus déjà contaminés. L'infestation est également réalisée, chez les grillons, *per os*, mais selon un processus original lié au mode de vie solitaire de ces Insectes. Le jeune reçoit des germes spécifiques grâce à une contamination extérieure du chorion de l'œuf : des bactéries sont donc transmises par les parents. A ces formes « congénitales », s'en ajoutent d'autres, moins nombreuses, ingérées en même temps que la nourriture.

La nature des germes n'a été suffisamment étudiée ni chez les *Grylloidea*, ni dans les groupes voisins d'Insectes, pour qu'une comparaison soit possible. Toutefois, la flore des grillons étant très pauvre en formes nucléées, diffère donc, de ce point de vue, de celle des Termites. Elle est essentiellement bactérienne, comme celle des Coléoptères lamellicornes, et elle est riche en espèces, dont six ont déjà été isolées et cultivées. Cette richesse des formes microbiennes la rapproche de celle du Coléoptère *Oryctes* (Marchall, 1963), où il existe des germes Gram $^+$ et des germes Gram $^-$, mais elle l'éloigne de la flore d'un autre Coléoptère, *Melolontha*, qui ne comprend qu'une espèce de bactéries (Couturier, 1961).

Pour les *Grylloidea*, comme pour les autres Insectes, le problème est évidemment de rechercher le rôle des bactéries dans la physiologie de l'hôte. Cet aspect des relations entre germes et Insecte a pu être abordé avec une relative facilité chez les grillons : leur taille plus importante en fait un matériel beaucoup plus favorable que le Termite aux techniques biochimiques; l'absence de bactéries ou levures intracellulaires simplifie l'interprétation des résultats expérimentaux; enfin, l'existence d'espèces dépourvues de segment bactérien et appartenant au même ordre des Orthoptères, permet de fructueuses comparaisons. L'association des Grillons et de leur flore ne constitue pas une nécessité absolue pour l'hôte. La croissance et la reproduction du Grillon axénique se déroulent sans perturbations majeures. En celà, les grillons diffèrent des blattes dont la défaunation de l'intestin est suivie d'un ralentissement de la croissance; ils diffèrent encore plus des Termites, qui ne peuvent vivre sans leurs micro-organismes intestinaux. Cette possibilité de vie apparemment normale, en l'absence de tout germe intestinal, est sans doute liée au régime omnivore des grillons. Les sources alimentaires sont très variées, et un régime complet et équilibré doit suffire, sans que des transformations de métabolites, dues aux bactéries, soient nécessaires. Mais le fait n'exclut pas une participation de la flore intestinale à certains mécanismes de la nutrition, même s'il ne s'agit que de mécanismes d'appoint.

Les germes intestinaux des *Grylloidea* interviennent en dégradant certaines substances non assimilables par l'hôte, ou en synthétisant des composés qui peuvent ensuite être incorporés aux réactions anaboliques de l'Insecte. Ainsi, ce sont sans doute les germes intestinaux qui sont responsables de la dégradation de la cellulose dans le tube digestif du Grillon. Une confirmation en est donnée par l'isolement, de l'iléon de *Gryllus campestris*, d'un bacille dont on connaît le pouvoir cellulolytique, *Bacillus thermocellulolyticum* (Vierne & Meynadier, sous presse). Des recherches complémentaires seront à entreprendre dès qu'une cellulose

pure pourra être utilisée, mais d'ores et déjà, il ne semble pas que les espèces pauvres en bactéries intestinales (*Acridoidea*) puissent utiliser ce polyoside. A cet égard, les *Grylloidea* différeraient des Thysanoures, mais au contraire se rapprocheraient des Coléoptères xylophages et des Termites.

Le problème de l'utilisation du soufre minéral a pu être abordé d'une façon plus complète et conduit à des résultats plus nets, les recherches pouvant être conduites à l'aide d'isotopes dont la pureté chimique est très grande. Nous savons que, chez les Mammifères, la réduction des sulfates, première étape de la conversion du soufre minéral en soufre organique, ainsi que la synthèse d'amino-acides soufrés qui en résulte, sont importantes pour les espèces qui possèdent une riche flore intestinale (Ruminants, Lapins), qu'elles sont moins importantes ou nulles chez ceux dont le tube digestif est pauvre en bactéries (Porc) (Pearson, 1956). Chez l'embryon d'Oiseau, la réduction est possible en l'absence de germes, mais elle ne conduit pas à la formation de composés soufrés d'une grande importance biologique. Chez les Insectes, la voie métabolique qui mène des sulfates à la méthionine et à la cystine, est bien représentée chez les Dictyoptères, dont les bactéroïdes intracellulaires assurent la réduction des ions SO_4. La situation est fort différente chez les Orthoptères. Si la réduction des sulfates est suivie, chez certains d'entre eux, d'une synthèse importante d'amino-acides soufrés, par des processus de transsulfuration qui n'ont pas été étudiés mais qui pourraient être conformes aux schémas classiques (formation de sulfite et intervention de molécules de sérine), ce sont les bactéries intestinales, et non des germes intracellulaires, qui interviennent. *Bacillus megaterium*, dont on sait qu'il réduit les sulfates (Bromfield, 1953) a d'ailleurs été isolé de l'iléon de *G. campestris* (Vierne & Meynadier). En premier lieu, les bactéries assurent la réduction des sulfates, seule étape du processus de conversion qui ne puisse être réalisée par un organisme supérieur. Mais, de plus, elles assurent elles-mêmes la synthèse des amino-acides soufrés, ce qui accentue les analogies entre Orthoptères et Mammifères Ruminants : dans les deux groupes, la mise en culture de la flore intestinale, en présence de sulfates, est suivie d'un enrichissement du milieu de culture en méthionine et en cystine (Pearson, 1956).

Le processus de transsulfuration qui conduit de la cystéine à la méthionine est rare chez les organismes supérieurs; il serait réalisé par l'embryon de Poulet. En ce qui concerne les Insectes, cette voie métabolique existe aussi bien chez les grillons que chez les blattes. Mais les germes mis en jeu sont de nature très différente, puisqu'il s'agit de formes extracellulaires chez les premiers, de bactéroïdes intracellulaires chez les seconds.

En ce qui concerne l'utilisation de l'urée, les faits sont d'une interprétation plus difficile. Très généralement, ce déchet du catabolisme des purines ne peut être utilisé par un organisme supérieur que dans la mesure où celui-ci possède une uréase capable de le dégrader en ammoniac et gaz carbonique, ou en sels d'ammonium (carbamate), que l'enzyme soit

propre à l'hôte ou d'origine bactérienne (Mammifères Ruminants, Termites). Les *Grylloidea* sont les seuls Orthoptères capables d'utiliser l'urée, mais, pour eux, une autre voie métabolique pourrait être envisagée. L'uréase, en effet, n'a pu être mise en évidence, ni chez les grillons eux-mêmes (Razet, 1961), ni dans les cultures de leurs bactéries intestinales (Vierne & Meynadier), bien qu'une bactérie du genre *Cillopasteurella* ait pu être isolée de l'iléon, bactérie dont on sait qu'elle hydrolyse l'urée (cité par Dumas, 1951). Jamais la mise en culture de la flore intestinale des grillons, en présence de ce déchet, n'est suivie d'un enrichissement du milieu en ammoniac libre, comme c'est le cas de la flore des Termites (Toth, 1952). Sans doute peut-on supposer que les germes intestinaux des Grillons peuvent métaboliser l'urée sans qu'une dégradation préalable soit nécessaire. Cette éventualité n'est envisagée qu'à titre d'hypothèse, la confirmation ne pouvant être apportée que par des recherches biochimiques ultérieures.

D'autres recherches seront également nécessaires pour que soit envisagée l'intervention de la flore intestinale dans la synthèse des vitamines, ou dans le métabolisme des glucides. Le rôle des bactéries intestinales dans la digestion des sucres est, en effet connu de longue date chez les Insectes (Pavlovsky & Sarin, 1922; Fletcher & Haub, 1933; Simmons, 1939). Chez *Gryllus campestris*, la plupart des bactéries isolées par Vierne & Meynadier, fermentent de nombreux oses.

Les Orthoptères possèdent donc une flore intestinale, plus ou moins développée suivant les sous-ordres, et cette flore intervient dans le métabolisme de l'hôte, en particulier dans l'utilisation de la cellulose et de l'urée, ainsi que dans le métabolisme du soufre. Par conséquent, il est intéressant de comparer ces Insectes à d'autres organismes supérieurs également pourvus de micro-organismes, c'est-à-dire à d'autres Insectes et à certains Mammifères. Les Orthoptères montrent à la fois certaines analogies et certaines différences avec les uns et les autres, tant du point de vue de la nature des germes hébergés que de l'importance des voies métaboliques dans lesquelles ceux-ci interviennent. Les comparaisons avec d'autres Insectes ne peuvent, toutefois, qu'être incomplètes, car aucune étude qui envisagerait tous les aspects de la symbiose n'a été réalisée, chez les Orthoptères ou dans les groupes voisins. Pour l'utilisation de l'urée, les Grillons sont comparables aux Termites et aux Ruminants, même si les mécanismes biochimiques diffèrent. Pour la cellulose, les *Grylloidea* se rapprochent des Mammifères et des Insectes xylophages, mais non des Thysanoures. Enfin, en ce qui concerne la réduction des sulfates et la synthèse des amino-acides soufrés, les Orthoptères sont comparables à la fois aux Dictyoptères et aux Ruminants pour les mécanismes biochimiques; la nature des germes, par contre, les rapproche seulement de certains Mammifères. Les Orthoptères représentent le premier groupe d'Insectes chez qui il ait été possible de mettre en évidence une intervention des germes intestinaux dans la réduction des sulfates. Les trois degrés d'association entre micro-organismes et Orthoptères, à savoir association de type *Acridoidea* (bactéries non localisées et très

peu nombreuses), association de type *Tettigonioidea* (flore non localisée mais assez importante), association de type *Grylloidea* (segment intestinal différencié en un segment bactérien), ont leur équivalents chez les Mammifères (type Porc; type Homme; type Lapins et Ruminants). Dans les deux groupes zoologiques, la densité et l'importance de la flore intestinale vont croissant du Porc aux Ruminants d'une part, des *Acridoidea* aux *Grylloidea*, d'autre part. Il en est de même pour la quantité de soufre minéral converti en soufre organique. Sans doute ne faut-il pas toutefois chercher des analogies trop grandes entre *Grylloidea* et Ruminants. De Serres écrivait en 1813 :

« Parmi les animaux Invertébrés, les insectes sont ceux dont l'appareil digestif est à la fois le plus compliqué et le plus développé, probablement par suite de leur voracité et de l'énergie de leurs forces vitales. Cette complication est même si grande dans un certain nombre d'espèces que presque tous les anatomistes ont pensé que la plupart des Orthoptères étaient chez les Insectes ce que sont les ruminans parmi les quadrupèdes. Malpighi, Swammerdam et les anatomistes qui leur ont succédé, ont considéré toutes les espèces d'orthoptères dont Linneus a formé un genre *Gryllus* comme faisant éprouver aux alimens une véritable rumination. Il devait paroitre cependant bien étonnant que ces insectes eussent besoin d'une aussi grande complication de moyens pour atteindre le but de la digestion, d'autant que, selon ces observateurs, les insectes ne se bornoient point à faire éprouver une seconde mastication aux alimens. L'on croyoit, en effet, avoir reconnu que, comme chez les ruminans, les alimens, après être parvenus dans le quatrième estomac, remontoient successivement dans le premier, et enfin jusque dans la bouche pour y éprouver une nouvelle mastication. »

Au XIX^e^ siècle, le genre *Gryllus* comprenait aussi bien des Acridiens que des grillons, et il n'est certes plus question, chez les uns comme chez les autres, d'une rumination, au sens mécanique de ce terme. Mais on peut regretter que De Serres et les naturalistes qui l'ont suivi, aient détourné l'attention des physiologistes de la géniale intuition des Anatomistes des XVII^e^ et XVIII^e^ siècles. Les interprétations de Malpighi ou de Swammerdam reposaient évidemment sur des bases fausses, mais ces auteurs n'en avaient pas moins pressenti certaines analogies entre la digestion des Orthoptères et celle des Ruminants, analogies qui, un jour, apparaîtront peut-être mieux, s'il s'avère possible, par exemple, de prouver l'intervention de la flore intestinale des grillons dans la synthèse des vitamines, synthèse bien connue chez les Mammifères (Mc Elroy & Goss, 1939; Elvehjem, 1948).

L'association entre micro-organismes intestinaux et *Grylloidea* revêt donc la forme d'une véritable symbiose, comme dans les groupes avec lesquels nous avons comparé les Orthoptères. L'hôte fournit à ses germes les métabolites qui lui sont nécessaires, les bactéries permettent à l'hôte d'utiliser des composés qu'il ne pourrait assimiler sans elles. Plusieurs segments intestinaux peuvent être impliqués dans l'absorption des métabolites résultant de l'action bactérienne. Il peut se produire, d'abord, une remontée du fluide bactérien et des débris alimentaires dans la lumière du mésentéron (segment lisse), lieu d'absorption le plus important du tube digestif. Une telle remontée existe effectivement,

mais elle est de peu d'importance et n'est pas comparable à celle qui a été décrite chez *Oryctes*, où le bol alimentaire et la flore bactérienne sont entièrement refoulés dans le mésentéron (Rössler, 1961). On peut concevoir également qu'une absorption s'effectue à travers l'épithélium du segment à villosités lui-même. Chez les Orthoptères, comme chez d'autres Insectes (Isoptères), les cellules proctodéales rappellent, par leurs caractères ultrastructuraux, les cellules rénales, la polarité étant inversée. Des arguments tirés de recherches sur l'osmo-régulation (Bonné & Koch, 1942; Ramsay, 1952 à 1955; Philip, 1961) ont, par ailleurs, prouvé leur rôle dans l'absorption de l'eau et dans la réabsorption d'ions provenant de l'excrétion. Il est remarquable de constater que, chez les grillons, la spécialisation de l'iléon, qui constitue un segment bactérien, n'altère en rien les caractères ultrastructuraux des cellules épithéliales de sa paroi, au moins en ce qui concerne les cellules cubiques. Étant donné le rejet, à un niveau postérieur, des déchets de l'excrétion, les cellules du segment à villosités ne peuvent intervenir dans la réabsorption des ions excrétés, ni, de ce fait, dans la régulation ionique. Mais cela n'exclut pas qu'elles puissent conserver une fonction absorbante. Ainsi, elles règleraient peut-être le degré d'hydratation de la suspension bactérienne, et interviendraient dans l'absorption des petites molécules organiques résultant de l'action des bactéries, l'épithélium du segment lisse (mésentéron) réalisant l'absorption des molécules ou agrégats moléculaires complexes issus de la dégradation des aliments par les enzymes de l'Insecte. C'est là un mécanisme qui, tout en faisant intervenir l'iléon dans l'absorption, est différent de celui qu'envisagèrent les anciens auteurs (Bordas, 1898; Berlese, 1909), pour qui les papilles étaient l'équivalent des villosités absorbantes des Mammifères. Ce sont au contraire les cellules situées entre celles-ci qui ont des caractères de cellules absorbantes. Il est ainsi possible de reprendre, pour les *Grylloidea*, l'hypothèse avancée par Bacetti (1962) à propos de la région absorbant les produits de la fermentation de la cellulose, chez les Termites.

La symbiose, chez les Insectes, n'est donc pas le propre, comme on l'a souvent prétendu, des espèces dont la monophagie est poussée à l'extrême, et notamment des espèces xylophages. Comme celui de certain Ruminant aquatique (Dubost, 1963), le régime alimentaire des grillons, omnivore, peut être partiellement carné. Bien que, dans ces conditions, l'association avec les micro-organismes ne soit pas obligatoire, l'hôte peut néanmoins tirer profit des synthèses effectuées par ses germes. Sans doute ceux-ci facilitent-ils la digestion et l'absorption d'aliments ingérés de façon habituelle par les grillons, par exemple de la cellulose, ou encore de l'urée qui existe en grandes quantités dans les champignons, dont ces Insectes sont friands. Il paraît moins utile que les *Grylloidea* puissent tirer profit de leur pouvoir de dégrader les sulfates, alors qu'ils trouvent dans leur régime détritique de multiples sources d'amino-acides soufrés indispensables. Il y a peut-être lieu de voir, dans cette possibilité d'utiliser un composé qui n'est pas indispensable, une sorte de « *préadaptation biochimique* », suivant l'expression de Dobzhansky (cité par Water-

HOUSE, 1952). Grâce à une telle préadaptation, une voie métabolique accessoire pourrait, un jour, devenir fondamentale pour l'espèce, si les conditions de milieu venaient à être modifiées. D'ailleurs, bien d'autres recherches sur la Nutrition ont montré qu'il existait souvent de grandes différences entre les besoins véritables d'un organisme et la qualité de la nourriture ingérée. Il appartient désormais au nutritionniste, plutôt que d'évaluer les *quantités* de protéines nécessaires à la croissance des grillons (Mc FARLANE, 1964), de déterminer avec précision les besoins alimentaires *qualitatifs* de ces Insectes, comme ces besoins ont été établis pour les Acridiens (DADD, 1957, 1960, 1961, *Schistocerca ;* NAYAR, 1964, *Melanoplus*) ou pour les Dictyoptères (*Blatella :* MELAMPY & MAYNARD, 1937; Mc CAY, 1938; HOUSE, 1949; NOLAND, LILLY & BAUMANN, 1949; HILCHEY, 1953; GORDON, 1959), et comme ils vont l'être pour les Termites (BREADY & FRIEDMAN, 1963). Les résultats de telles recherches, qui n'en sont actuellement qu'à leur début (NEVILLE & LUCKEY, 1962), feront sans doute apparaître que les besoins alimentaires des grillons sont plus restreints que ceux des autres Orthoptères, certaines substances, habituellement considérées comme indispensables, pouvant être synthétisées par les premiers. Il est à prévoir que ces résultats accentueront encore les ressemblances entre grillons et blattes, et les différences entre grillons et Acridiens, analogies et différences qui sont apparues à l'occasion de ce travail.

DEUXIÈME PARTIE

RICKETTSIELLA GRYLLI VAGO & MARTOJA, RICKETTSIE PATHOGÈNE DES ORTHOPTÈRES

Alors que les rickettsies pathogènes des Vertébrés ont fait l'objet d'un grand nombre de travaux, celles qui appartiennent à la tribu des *Wolbachiae*, et qui n'ont d'affinité que pour les Arthropodes, sont relativement méconnues. Trois des quatre genres qui ont été décrits, *Rickettsoides*, *Enterella* et *Wolbachia*, ne constituent pas un matériel favorable à des recherches de pathologie, car leur développement dans l'organisme de l'hôte est limité, au point que certains sont même inoffensifs (*Wolbachia*). Par contre, le quatrième genre, *Rickettsiella*, rassemble des formes pathogènes pour les Insectes qu'elles contaminent. Sa découverte est très récente, si bien que les données bibliographiques sont encore peu nombreuses. Ce n'est, en effet, qu'en 1950 que DUTKY & GOODEN découvrent la première *Rickettsiella*, *R. popiliae* (= *Coxiella popiliae*), parasite de Coléoptères. Quelques années plus tard sont décrites, chez les Coléoptères également, *R. melolonthae* (WILLE & MARTIGNONI, 1952; HURPIN & VAGO, 1958) et *R. stethorae* (HALL & BADGLEY, 1957), cette dernière espèce ayant une position systématique assez douteuse (*Enterella stethorae*, KRIEG, 1963). En 1958, MULLER-KOGLER signale une rickettsie pathogène d'un Diptère, *R. tipulae*, et, en 1964, HUGER découvre une autre *Rickettsiella*, chez les Dictyoptères (*R. blattae*). Pour l'une de ces espèces, les recherches n'ont pas dépassé le stade de la détermination. Dans d'autres cas, une liste sommaire des organes envahis est donnée (HUGER, 1958, pour *R. stethorae*; VAGO, 1959, pour *R. melolonthae*). C'est aussi l'évolution de la pathogenèse, étudiée par les méthodes de la microscopie électronique, qui a retenu l'attention des chercheurs (VAGO & CROISSANT, 1960). Il en résulte que, pour ces rickettsioses, nous ne possédons pas, à l'heure actuelle, de données suffisantes concernant l'histopathologie des Insectes contaminés.

L'apparition fortuite, dans les élevages de grillons du laboratoire, d'une épizootie, dont le germe, déterminé par VAGO, appartient lui-aussi au genre *Rickettsiella* (*R. grylli* VAGO & MARTOJA, *n. sp.*), fournissait l'occasion d'entreprendre une étude détaillée de la pathogenèse rickettsienne à l'échelle de la microscopie photonique. Par ailleurs, si l'on excepte *R. blattae* dont la découverte est postérieure à celle de *R. grylli*, cette dernière représentait le premier exemple connu d'une espèce ayant pour hôte un Hétérométabole. Il devenait alors possible de suivre l'évolution de la maladie à tous les stades de la vie des Insectes, et aussi de rechercher

ses effets sur l'appareil génital. *R. grylli* pouvait constituer, à cet égard, un matériel beaucoup plus favorable que les rickettsies pathogènes des Holométaboles, chez qui la nymphose représente une étape fatale lorsque l'Insecte est contaminé au stade larvaire.

C'est dans le cadre de ces recherches sur *R. grylli*, que Seureau (1965) a tracé l'évolution de la pathogenèse et établi les courbes de mortalité, chez deux espèces de *Gryllus* contaminés à l'éclosion. Ce sont d'autres aspects de cette rickettsiose qui font l'objet des recherches exposées ici : caractères morphologiques et histochimiques des germes, sensibilité des divers organes, dégradations des tissus contaminés et conséquences pour l'hôte, réactions secondaires d'autres tissus, affinités du germe pour divers Orthoptères, propagation de l'épizootie et traitement des Insectes malades, constituent les divers points envisagés.

DESCRIPTION DE LA MALADIE CHEZ LES GRILLONS

L'apparition de la rickettsiose au laboratoire n'a pu être ni datée ni rapportée à l'introduction, dans les élevages, d'une espèce déterminée de grillons. Lorsque les épizooties furent reconnues, la maladie s'était déjà manifestée dans un grand nombre d'espèces : *Gryllus bimaculatus*, *G. campestris*, *G. capitatus*, *G. posticus*, *G. assimilis*, *G. argentinus*. Toutes étaient élevées en phase groupée. Dans les terrariums, les pourcentages des nymphes ou des imagos qui présentaient des troubles graves se sont révélés très variables d'une espèce à l'autre, ou même d'une souche à l'autre. Le tableau suivant indique la proportion des individus malades pour quelques espèces ou souches du laboratoire, dans les deux premiers mois de 1963. Le taux des malades est évalué après dissection de 50 Insectes, et en prenant en considération les désordres anatomiques qui seront énumérés plus loin.

Espèces	Souches	Pourcentage de malades
G. capitatus.....	Lima (Pérou)	70 à 96 suivant les terrariums
G. argentinus		70
G. bimaculatus.....	Maroc	10
	Viet-nam	15
	Côte-d'Ivoire	30

Dans tous les cas, le nombre des grillons malades est partagé de façon égale entre les mâles et les femelles.

Les individus atteints de rickettsiose se distinguent des animaux sains par la taille et surtout par le volume considérable de leur abdomen. C'est chez les nymphes et chez les imagos que le gonflement abdominal est le plus apparent, surtout chez les femelles et dans les espèces où le

tégument est relativement extensible (*G. capitatus*) (fig. 10 et 11). A un stade très avancé de la maladie, non seulement les pleurites abdominaux sont distendus, mais, de plus, les membranes intersegmentaires deviennent saillantes au niveau du cou, à la base des élytres et des pattes. Chez les espèces à tégument brun foncé ou noir (*G. bimaculatus*), les membranes intersegmentaires se reconnaissent d'emblée par leur couleur très claire. La turgescence de celle qui sépare la tête du thorax est telle que l'Insecte ne peut maintenir sa tête dans sa position habituelle, et que celle-ci est fortement inclinée ventralement (fig. 10). De même que le volume, qui peut être augmenté d'un tiers environ, le poids des grillons malades est plus élevé que celui des grillons sains : le poids moyen des femelles saines de *G. capitacus*, à l'état imaginal, est de 1 g; à un stade avancé de la maladie, il est de 1,300 g, et peut atteindre 1,500 g. Toutefois, ce gonflement et cette augmentation de poids n'entraînent pas de réduction appréciable de l'activité des Insectes. Ceux-ci se nourrissent normalement, et leur instinct sexuel n'est pas perturbé. Les mâles chantent et s'accouplent. Pourtant, dans la plupart des cas, le mâle ne transmet aucun spermatozoïde à sa partenaire femelle, si bien que, dans un délai très bref, de quelques minutes, on peut assister à une dizaine de tentatives d'accouplement. La plupart des femelles malades ne pondent pas. Les

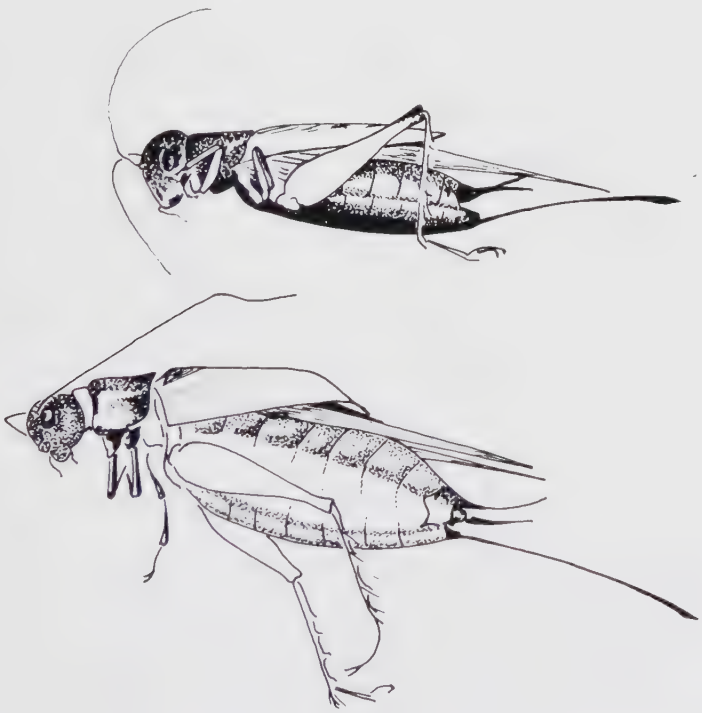


FIG. 10, Morphologie comparée de femelles de Grillon sain (*G. bimaculatus*), en haut, et de Grillon atteint de rickettsiose (même espèce), en bas.

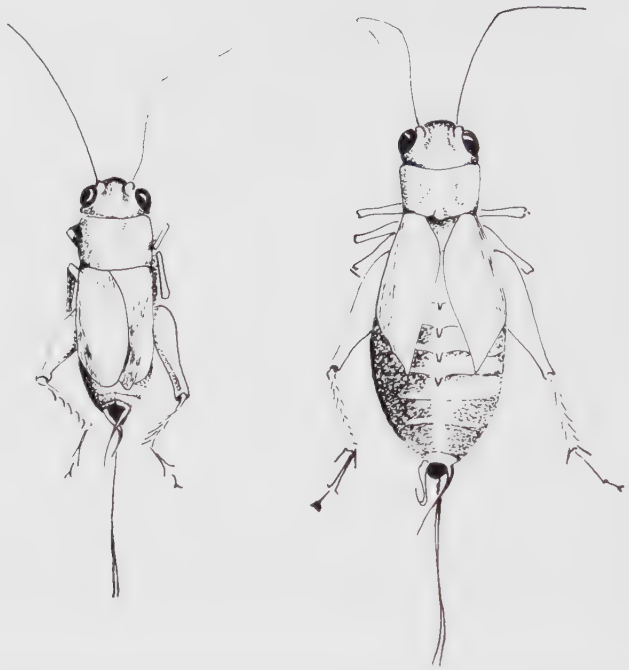


Fig. 11, Morphologie comparée de femelles de Grillon sain (*G. capitatus*), à gauche, et de Grillon atteint de rickettsiose (même espèce), à droite.

Insectes qui se trouvent dans un état de gonflement accentué sont extrêmement sensibles aux accidents; au cours des manipulations nécessitées par l'entretien des élevages, il suffit de chocs minimes, qui seraient sans effets sur les animaux sains, pour provoquer la mort instantanée des malades. Souvent, le moindre contact entraîne une perforation du tégument; une bouillie dense, d'un blanc opalescent, s'échappe de la blessure. Lorsque la mort n'est pas provoquée par un tel choc, elle s'accompagne de tremblements des pattes, l'Insecte s'étant auparavant couché sur le dos.

I. — Caractères anatomiques des Grillons malades

Les grillons atteints de rickettsiose présentent, à l'examen anatomique, un certain nombre de particularités assez spectaculaires, qui se révèlent constantes dans la mesure où l'on prend soin de choisir des imagos dont le gonflement de l'abdomen est net. Dans les deux sexes, l'hémolymphe est très abondante et paraît trouble. Seul le tube digestif reste bien individualisé et son aspect est normal. Les tubes de Malpighi sont souvent difficiles à reconnaître. Les testicules apparaissent mal, et les glandes annexes de l'appareil génital mâle sont souvent absentes. Les ovaires

sont d'une couleur blanche qui diffère beaucoup de la coloration jaune normale; ils sont d'une taille très réduite qui n'excède pas celle des ovaires de nymphe. L'ensemble de la cavité générale est rempli d'une abondante bouillie blanchâtre, que j'ai précédemment appelée « tissu opalescent » (Martoja, 1963). Ce tissu est très différent du corps gras qui, chez les imagos sains, est peu développé et d'un jaune parsemé de points blancs correspondant aux urates; il n'existe plus chez les imagos malades. Le tissu opalescent masque tous les organes de petite taille, comme l'appareil excréteur ou le système nerveux, dont la présence ne peut être recherchée que par les méthodes de l'histologie. Enfin, dans la région ventrale de l'abdomen, le tissu opalescent est parfois parsemé de minuscules nodules bruns, assez rares.

Chez les larves et chez les nymphes, les dégradations anatomiques sont moins accentuées. Ceci peut être en relation avec l'évolution moins avancée de la maladie, mais résulte également du développement moins important, à ce stade, de la plupart des organes, notamment de l'appareil génital. Il s'ensuit que le contraste entre larves malades et larves saines est peu prononcé.

II. — Caractères morphologiques et histochimiques des germes

Après purification et examen au microscope électronique, *Rickettsiella grylli* apparaît d'une forme ovoïde de 640 mμ sur 250 mμ; il existe aussi des formes géantes (Vago & Martoja, 1963). Lorsqu'ils se trouvent en concentration suffisante dans les tissus, il devient possible d'étudier leurs affinités tinctoriales et leurs caractères histochimiques. Ceux-ci sont portés dans le tableau 9. D'une façon générale, les rickettsies sont très basophiles, propriété qui peut être attribuée à leur grande richesse en acides nucléiques. Leur teneur en A.D.N. est particulièrement élevée, et les réactions nucléales donnent des résultats fortement positifs. Les germes sont dépourvus de polysaccharides histochimiquement décelables. Ils contiennent la plupart des groupements protidiques habituels. Les lipides soudanophiles manquent, mais les phospholipides sont très abondants. Parmi toutes les enzymes recherchées, seules les phosphomono-estérases acides ont été décelées; leur activité est très élevée, et elle est inhibée par le fluorure de sodium.

Certains caractères n'apparaissent avec netteté que dans la mesure où ils contrastent suffisamment avec ceux du cytoplasme des cellules envahies. C'est pourquoi la détection histologique des germes dans une cellule n'est possible que si la cellule examinée est dépourvue des constituants qu'on se propose de révéler dans les rickettsies. Aussi, les meilleures méthodes à cet égard, celles qui sont valables pour toutes les catégories de cellules-hôtes, sont les réactions nucléales (Feulgen ou de Lamatter). Dans les tissus dont la basophilie est faible, ce caractère peut également se révéler très utile pour la caractérisation des rickettsies (méthode de R. y Cajal).

TABLEAU 9. — AFFINITÉS TINCTORIALES ET CARACTÈRES HISTOCHIMIQUES DES CONCENTRATIONS DE *Rickettsiella grylli* DANS LES TISSUS DE *Gryllus bimaculatus* ET *G. capitatus*.

Azan de Heidenhain	rose.
Trichrome de R. y Cajal	rouge.
Trichrome en un temps	rouge.
Trichrome de Prenant	brun ou rose selon fixation.
Hémalun-picro-indigocarmin	brun ou vert selon fixation.
Mann-Dominici	violet ou rose selon fixation.
Composés APS-positifs	+
GLUCIDES	
glycogène	—
mucopolysaccharides acides	
— bleu alcian	
— Hale	
— métachromasie γ	
PROTIDES	
α-amino-acides	+
amino-acides phénoliques	+
tyrosine	
protides sulfhydrilés	+
indols	
LIPIDES	
lipides soudanophiles	—
phospholipides	+++
A.D.N.	+++
A.R.N.	+++
ENZYMES	
phosphomono-estérases alcalines	—
phosphomono-estérases acides	
— méthode au plomb	+++
— azoréaction	+++
tween-estérases	—
naphtolacétylestérase	—

III. — Évolution morphologique des foyers rickettsiens dans les cellules infectées

Les premières phases de la pathogenèse intracellulaire échappent à l'examen, en microscopie photonique, la quantité d'A.D.N. des germes isolés ou faiblement groupés n'étant pas suffisante pour être décelée par les méthodes utilisées. Ce n'est qu'à partir du moment où les rickettsies sont suffisamment nombreuses et groupées qu'il devient possible de les détecter. Le schéma de l'évolution de la maladie est, dès lors, le même pour toutes les catégories cellulaires (fig. 12).

Dans le cytoplasme, les premiers signes d'infection sont représentés par de petits groupements sphériques de germes qui, dans certaines conditions favorables d'observation, apparaissent condensés au centre

d'une vacuole (Pl. 14, fig. 3). Ces premiers foyers rickettsiens correspondent donc à des formations qui, jusqu'alors, ont reçu des noms divers, à propos d'autres rickettsioses : *Herde*, *N.R. bodies*, *Bläschen*, *Infektionsnester*, *globular centers*, *colonies*, *initial bodies*, *corps globulaires*. C'est ce dernier terme qui sera utilisé ici, même s'il n'existe pas toujours une correspondance exacte entre les images de la microscopie électronique, qui sont à l'origine de ce terme, et celles de la microscopie photonique.

Plus tard, tout en gardant leur individualité, les corps globulaires augmentent en nombre, jusqu'à emplir presque complètement le cytoplasme. Aucune forme cristalloïde, pourtant fréquente dans les autres rickettsioses, n'apparaît. A la fin de la pathogenèse, les limites cellulaires s'estompent, et il ne subsiste de la cellule que le noyau et une quantité insignifiante de cytoplasme. Le noyau devient pycnotique et les corps globulaires se fondent en une masse homogène qui représente une sorte de culture rickettsienne. Ce schéma de l'évolution morphologique des corps globulaires ou des plages rickettsiennes qui résultent de leur confluence, étant identique pour tous les tissus envahis, il en résulte que plusieurs tissus adjacents verront leurs limites s'estomper peu à peu et leurs parties infectées se confondre en une masse unique (fig. 12). Un tissu nouveau se constitue donc peu à peu aux dépens de plusieurs types cellulaires; c'est une sorte de suspension de rickettsies qui apparaît blanchâtre à l'examen anatomique, et auquel j'ai donné le nom de « tissu opalescent ». Le tissu opalescent se révèle ainsi très hétérogène, non par sa structure, mais par son origine. Pourtant, tous les organes ne participent pas de façon égale à sa formation, car leur sensibilité aux germes varie de l'un à l'autre. Il faut donc envisager, en premier lieu, les caractères histopathologiques de la maladie, afin de mettre en évidence ces différences de sensibilité.

IV. — Caractères histopathologiques de la rickettsiose

Je donnerai d'abord une description de l'état des organes chez des nymphes et des imagos de *G. bimaculatus* et *G. capitatus*, choisis parmi les individus qui présentent les symptômes les plus accentués dans les élevages contaminés. Les descriptions correspondent aux désordres les plus importants qu'il soit possible d'envisager. Les organes seront énumérés dans un ordre qui tient compte de leur sensibilité à la maladie, les plus sensibles étant ceux qui sont à la fois le plus fréquemment envahis et le plus profondément dégradés (*).

Ces résultats seront ensuite comparés aux données obtenues par Seureau (1965) après contamination expérimentale de grillons à divers stades, larvaires ou imaginal.

(*) Les méthodes de l'hématologie n'ayant pas été appliquées, aucune description de l'hémolymphe ne sera donnée. J'indiquerai seulement que, pour *R. grylli* comme pour *R. melolonthae*, la phase terminale de la maladie consiste en une « septicémie de sortie » (Vago, 1959).

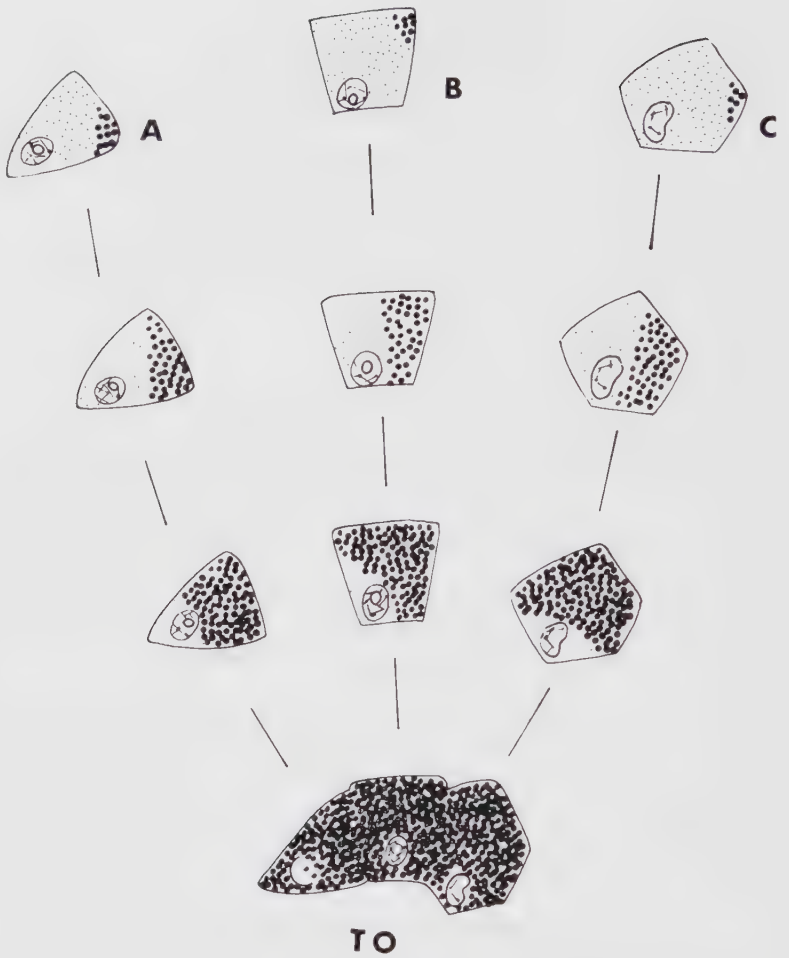


Fig. 12, Schéma montrant la constitution du tissu opalescent (TO) aux dépens de 3 lignées cellulaires A, B, C appartenant à 3 tissus différents.

Le *corps gras* présente, chez les imagos sains, un dimorphisme sexuel très marqué (Martoja & Lauverjat, 1965) : le tissu mâle, comme celui des larves, a un aspect treillissé, dû à sa teneur élevée en glycérides et en glycogène, et il est pauvre en A.R.N.; celui de la femelle est très compact, le cytoplasme est très développé, riche en A.R.N., mais très pauvre en glycogène. Chez les imagos qui présentent les symptômes de la rickettsiose, le corps gras a presque toujours disparu, ou plus exactement toutes ses cellules se sont incorporées au tissu opalescent. En effet, au niveau du tissu adipeux, l'infection est à la fois constante et très importante. Quand il est possible d'en observer encore quelques lobes dont l'infection ne soit pas totale (pl. 15, fig. 3 et 4) on constate que celle-ci commence par la périphérie, et gagne progressivement le centre des lobes. Dans le cas

de femelles dont l'ovaire est en cours de vitellogenèse, on devrait s'attendre à trouver, pour les cellules adipeuses encore saines, les aspects du tissu femelle, puisque ces caractères sont normalement acquis au début de la vie imaginale, avant le début de la vitellogenèse. Or, dans les lobes incomplètement envahis, les parties saines correspondent toujours à un tissu de type larvaire (ou mâle) : le cytoplasme est très peu développé, très pauvre en amino-acides et en A.R.N. relégué au niveau de rares granules périnucléaires; le glycogène est abondant, les globules lipidiques nombreux et volumineux. Dans l'ensemble, les parties saines ont un aspect « treillissé » (pl. 15, fig. 4) tout à fait inconnu chez les femelles saines; lorsqu'il paraît un peu plus compact, cet aspect est dû à des plages d'hémolymphe (pl. 15, fig. 3). Au cours de l'infection, la compacité du tissu, dans les deux sexes, augmente considérablement. Elle est provoquée, non par un accroissement du cytoplasme, mais par la multiplication des germes qui, groupés initialement en corps globulaires, finissent par former une masse homogène entourant le noyau. Au dernier stade de la pathogenèse, l'aspect est celui du tissu opalescent, qui sera décrit plus loin. Les cellules à urates existent à tous les stades de l'infection. Elles paraissent d'une taille beaucoup plus réduite que chez l'animal sain, ce qui pourrait correspondre à une invasion des régions périphériques du cytoplasme.

Les *œnocytes* n'ont pas fait l'objet de recherches histologiques récentes chez les Orthoptères. Ils sont très nombreux chez l'imago, surtout au niveau de l'abdomen. Ils sont groupés en nids ou en bandes dans le corps gras périphérique. Ce sont de volumineuses cellules qui peuvent atteindre 50 μ. Leur noyau, central, contient des groupes de mottes de chromatine et un volumineux nucléole. Le cytoplasme renferme des grains et des filaments basophiles, épars, riches en A.R.N. Cytoplasme et nucléole contiennent des protides sulfhydrilés. Les amino-acides phénoliques sont abondants, surtout au niveau de l'ergastoplasme. Du glycogène, ainsi que des granules de chromolipoïdes, peuvent s'y rencontrer occasionnellement.

Étant constitué de cellules volumineuses et bien individualisées, ce tissu représente un matériel favorable pour l'étude de l'évolution de l'infection intracellulaire. Le premier signe histologiquement décelable est un petit corps globulaire, d'environ 5 μ de diamètre, qui apparaît en un point quelconque du cytoplasme, et qui représente une masse de germes incluse dans une vacuole (pl. 14, fig. 3). Il se colore d'abord assez faiblement par les réactions nucléales. Puis, il s'accroît jusqu'à atteindre un diamètre de 12 à 15 μ, en même temps que sa teneur en A.D.N. augmente, traduisant ainsi l'augmentation du nombre des germes dans cette formation. D'autres corps globulaires naissent dans la cellule infectée, dont la section peut alors en contenir une douzaine (pl. 14, fig. 4). Ils sont d'autant plus petits qu'ils sont plus nombreux, mais toujours bien individualisés grâce à des trabécules cytoplasmiques qui les séparent. Ils peuvent, à ce stade, être très facilement mis en évidence, aussi bien par leur richesse en A.D.N. et en A.R.N. que par leur pauvreté en protides sulfhydrilés et phénoliques, pauvreté qui contraste avec la teneur élevée du cytoplasme de l'œnocyte. Des pigments bruns font parfois leur apparition, dans le noyau et dans le

cytoplasme. Ensuite, les corps globulaires deviennent si nombreux qu'il est difficile d'observer de larges plages de cytoplasme (pl. 15, fig. 1); la cellule prend alors une forme irrégulière, souvent étoilée, et elle donne l'illusion d'avoir diminué de volume. Les limites cellulaires deviennent imprécises, et enfin, les restes des œnocytes sont incorporés au tissu opalescent, où, pourtant, les noyaux persistent et restent indemnes. On en retrouve un grand nombre, dans les régions ventrales de l'abdomen, c'est-à-dire dans les parties du corps initialement riches en œnocytes. Il est probable qu'ils finissent par dégénérer.

Dans les plages cytoplasmiques, l'A.R.N. et les amino-acides subissent une évolution parallèle au cours de la pathogenèse. La répartition des ribonucléines, par exemple, est identique dans les cellules saines et au premier stade de l'infection. Puis, parallèlement à l'augmentation du nombre des corps globulaires, les filaments et granules pyroninophiles perdent leur individualité; l'A.R.N. se trouve alors condensé dans le cytoplasme périnucléaire, non envahi, ainsi que dans de fins trabécules cytoplasmiques (pl. 15, fig. 2). Plus tard, quand les limites cellulaires ont disparu, on retrouve, autour des noyaux incorporés au tissu opalescent, une auréole très fine d'A.R.N., hérissée de prolongements de même nature. Enfin, ribonucléines et amino-acides s'estompent, alors que les noyaux gardent encore leur colorabilité.

L'incorporation des œnocytes au tissu opalescent doit provoquer une diminution du nombre de ces cellules chez les animaux malades. Dans le but de vérifier cette hypothèse, j'ai effectué quelques numérations sur des coupes transversales d'abdomen de grillons sains et de grillons malades. J'ai choisi des imagos mâles présentant une infection très prononcée avec disparition complète du corps gras. Les numérations ont été effectuées sur des coupes à 3 niveaux différents : dernier ganglion abdominal, point de jonction des canaux déférents et du canal éjaculateur,

Légendes de la planche

PLANCHE XIV

Rickettsiose des Gryllides (*Gryllus bimaculatus*).

Fig. 1 et 2, Coupe parasagittale d'une deutonymphe (Trichrome de R. y Cajal, 10 diamètres). Remarquer le grand développement du tissu opalescent, bien que l'abdomen ne présente encore aucun gonflement. Ce tissu (en noir) est visible à tous les niveaux du corps.

Fig. 3, Deux corps globulaires dans un œnocyte (Feulgen-picro-indigocarmin, 650 diamètres). Les rickettsies sont rétractées au centre de vacuoles.

Fig. 4, Série d'œnocytes au début de la pathogenèse (Trichrome de R. y Cajal, 350 diamètres). Les corps globulaires sont bien distincts dans le cytoplasme. Les œnocytes sont inclus dans le tissu opalescent (en noir, en haut et en bas du cliché).

1
2
3
4

partie postérieure des testicules. Les numérations ont donné les résultats suivants :

	Nombre des œnocytes (pour 16 animaux)	
	Grillons sains (8 animaux)	Grillons malades (8 animaux)
1er niveau	200	80
2e niveau	250	90
3e niveau	300	40
Total des 3 niveaux	750	210

Légendes de la planche

PLANCHE XV

Rickettsiose des Gryllides (*Gryllus bimaculatus*).

Fig. 1, Stade plus avancé de l'infection des œnocytes (Trichrome de R. Y. Cajal, 450 diamètres). Le cytoplasme des cellules est réduit, les corps globulaires très volumineux. Le tissu opalescent, en noir, enserre les cellules de toutes parts.

Fig. 2, Stade terminal de l'infection des œnocytes (vert de méthyle-pyronine, 450 diamètres). Dans la cellule du centre du cliché, les foyers rickettsiens, en gris, emplissent presque tout le cytoplasme. Les ribonucléines, en noir, occupent le cytoplasme périnucléaire et les travées cyroplasmiques, très réduits.

Fig. 3, Début d'infection d'un lobe de corps gras, chez un imago femelle gravement atteint (Feulgen-picro-indigocarmin, 100 diamètres). Remarquer les foyers rickettsiens (en noir) disposés en couronne à la périphérie du lobe. Le centre est plein d'hémolymphe.

Fig. 4, Détail du cliché précédent. Les rickettsies sont visibles à la périphérie du lobe, en haut et en bas à droite du cliché. Remarquer l'aspect treillisé du tissu, très riche en grosses vacuoles, aspect inhabituel chez un imago femelle, mais constant chez une larve ou un imago mâle.

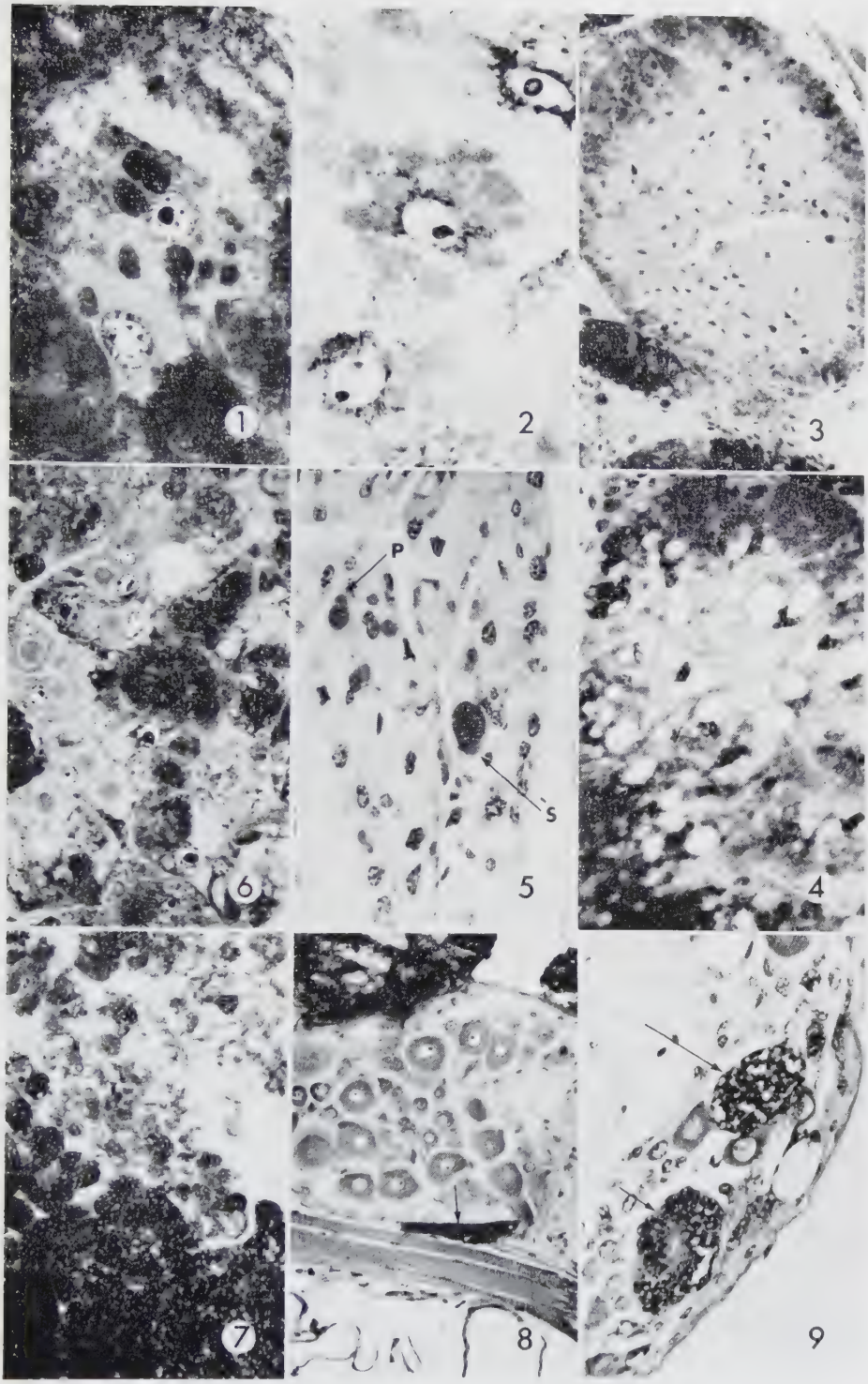
Fig. 5, Début d'infection des glandes salivaires (Feulgen-picroindigocarmin, 350 diamètres). Les foyers rickettsiens apparaissent aussi bien dans les cellules périphériques (p) que dans les cellules sécrétrices (s).

Fig. 6, Infection plus avancée des glandes salivaires (Trichrome de R. y Cajal, 250 diamètres). Toutes les cellules du centre de l'acinus sont remplacées par des plages rickettsiennes, en noir.

Fig. 7, Infection maximum observée dans les glandes salivaires (Trichrome de R. y Cajal, 100 diamètres). Le tissu opalescent occupe la moitié inférieure du cliché, les acini glandulaires la moitié supérieure. Remarquer le grand nombre des cellules complètement infectées dans les acini, et surtout le passage graduel de ceux-ci au tissu opalescent.

Fig. 8, Début d'infection d'un ganglion nerveux abdominal (Trichrome de R. y Cajal, 100 diamètres). Une volumineuse masse rickettsienne (flèche) pénètre dans le ganglion par effraction de l'épinèvre.

Fig. 9, Stade terminal de l'infection de deux volumineux neurone. (Trichrome de R. y Cajal, 100 diamètres). Les deux volumineux péricaryons (flèches) sont complètement remplis par les germes, en noir.


1
2
3
6
P
5
S
4
7
8
9

Le nombre des œnocytes n'est donc plus que de 20 % environ à ce stade de la maladie. Par ailleurs, toutes les cellules qui furent dénombrées chez les malades étaient en cours d'infection. Il est probable que la mort de l'Insecte survient avant la disparition totale de ces cellules. C'est sans doute en raison du nombre élevé des œnocytes et de leur possibilité de différenciation au cours de la vie larvaire qu'il est encore possible d'en dénombrer un pourcentage appréciable à ce stade ultime de la maladie.

Les *glandes salivaires* n'ont pas été décrites chez les grillons depuis Bordas (1898). Nous possédons une description histologique chez *Schistocerca gregaria* (Chauvin, 1941) où deux types de cellules coexistent dans les acini : des cellules glandulaires, volumineuses, et des cellules périphériques qui donnent naissance aux canaux salivaires. L'infection commence, dans l'un ou l'autre type cellulaire, par un corps globulaire bien délimité (pl. 15, fig. 5). Le cytoplasme des cellules glandulaires est ensuite rapidement envahi par une multitude de corps globulaires coalescents, qui ménagent entre eux des lambeaux de cytoplasme riches en A.R.N. et quelques grains de sécrétion. Dans les cellules périphériques, tout le cytoplasme est envahi, et il ne subsiste que le noyau et le canalicule intracellulaire. Dans les acini profondément atteints, les cellules saines côtoient les cellules complètement envahies (pl. 15, fig. 6). Plus tard, l'acinus n'est plus qu'une masse de rickettsies où l'on distingue encore les noyaux des cellules détruites. Des lipides soudanophiles apparaissent alors, et l'incorporation au tissu opalescent a lieu (pl. 15, fig. 7). Le nombre des cellules atteintes est toujours considérable. En raison de l'état diffus de l'organe et de son développement très variable à des niveaux précis, aucune numération n'est possible. Même chez les Insectes parvenus au dernier stade de la maladie, ou morts de rickettsiose, il subsiste toujours des cellules saines.

L'appareil génital mâle comprend les testicules, les canaux déférents, des glandes annexes et le canal éjaculateur. Les testicules ont fait l'objet, chez *G. domesticus*, d'une description histologique récente (Echard, 1962). J'ajouterai à cette description l'existence, entre les tubes séminifères, de quelques cellules interstitielles (pl.16, fig. 1, 2, 3). La majeure partie des glandes annexes est constituée de tubes mésodermiques qui débouchent dans le réservoir glandulaire prolongeant le canal éjaculateur. J'ai indiqué précédemment que les données les plus récentes (Hirowo-Ito, 1924) ne rendent pas compte de la complexité de l'organe.

Chez les imagos de *G. bimaculatus* et *G. capitatus*, l'infection de l'appareil génital mâle est constante, mais se présente différemment suivant les individus examinés. Les aspects observés correspondent à des stades progressifs de la dégradation de ce système. Dans tous les cas, seule la gonade est envahie par les rickettsies.

Quand la dégradation n'est pas trop avancée, le testicule garde un aspect voisin de la normale; les glandes annexes sont très développées et fonctionnelles. La paroi de la gonade, qui est épaissie, contient de nombreux corps globulaires. Entre les tubes séminifères, il existe d'importants

amas de rickettsies, qui paraissent découpés par des cloisons conjonctives. Chez l'Insecte sain, les tubes séminifères contiennent des cystes où sont groupés les éléments germinaux, la membrane des cystes étant accolée à celle des tubes (pl. 16, fig. 3). C'est dans l'espace quasi-virtuel qui existe entre ces deux membranes que les germes commencent à se multiplier. L'accroissement de taille des foyers rickettsiens qui s'y développent entraîne le décollement progressif de la membrane des cystes de celle des tubes (pl. 16, fig. 4).

Au stade suivant, les cystes se trouvent inclus au centre d'une masse importante de germes, eux-mêmes enveloppés dans la paroi des tubes. Puis cette dernière devient assez difficile à caractériser. La gonade apparaît alors comme une masse de rickettsies contenant des cystes. Mais l'examen histologique permet toujours de reconnaître, parmi cet amas de germes, des membranes cyanophiles, parsemées de noyaux, qui correspondent aux anciennes parois des tubes (pl. 16, fig. 5 et 6). Cette masse de germes contient également des trachées. Dans les cystes, la spermatogenèse se déroule de façon normale, et les spermatozoïdes sont nombreux. Il n'existe plus de cellules interstitielles. Les voies génitales restant saines, et les glandes annexes fonctionnelles, les Insectes parvenus à ce degré de contamination restent féconds. Mais déjà il est possible de reconnaître quelques foyers rickettsiens à l'intérieur même des cystes, parmi les cellules germinales les plus périphériques (pl. 16, fig. 7).

A un stade plus avancé, la paroi des testicules est complètement envahie et les masses de germes occupent un volume considérable dans la gonade. La spermatogenèse est encore normale dans certains cystes. Mais il n'existe souvent aucune glande annexe mésodermique; le réservoir glandulaire qui surmonte le canal éjaculateur ne reçoit aucun tube glandulaire (pl. 17, fig. 4).

Plus tard, la paroi de la gonade se distingue mal du tissu opalescent qui l'entoure. L'espace interne est occupé en majeure partie par les rickettsies. Les cystes sont peu nombreux et de très petite taille. Leur paroi, épaisse, est bien visible encore. Certains sont vides, d'autres contiennent quelques nids de cellules germinales dont le stade d'évolution est difficile à préciser (pl. 16, fig. 8, 9 et 10 et pl. 17, fig. 1 et 2); aucun ne contient de spermatozoïdes. La masse des rickettsies est découpée par les restes des cloisons des tubes séminifères. Le canal déférent reste sain, mais d'un calibre réduit. Il n'existe pas de glandes annexes et les Insectes, qui n'élaborent ni spermatozoïdes ni spermatophores, sont toujours stériles.

La dégradation peut être encore plus profonde. La paroi de la gonade est alors amincie en certains endroits, alors qu'ailleurs elle est envahie par des éléments conjonctifs qui prolifèrent autour des foyers rickettsiens. Les cystes sont très peu nombreux, réduits à leur paroi fortement plissée (pl. 17, fig. 3). Ils contiennent, au lieu de cellules germinales, un coagulum ayant l'aspect de l'hémolymphe. Le canal déférent est sain, ainsi que les voies génitales. Il n'existe aucune glande annexe mésodermique. Ce stade correspond au degré de dégradation le plus accentué qu'il m'ait été possible d'observer. Jamais je n'ai pu observer une disparition complète de

la gonade. Même quand sa paroi s'estompe en certains points et qu'il n'existe plus de limite entre le tissu opalescent et les masses de rickettsies qui se sont développées dans le testicule, il persiste toujours des restes de cystes ou de canalicules intra-testiculaires.

Chez tous les animaux examinés, les deux bandes de cellules de l'*organe phagocytaire* contiennent un nombre très élevé de cellules complètement envahies. Dans de nombreux cas, les cellules qui contiennent les rickettsies sont situées à la périphérie des cordons cellulaires, où elles forment de longues files. Mais il existe aussi des cas où l'infection beaucoup plus avancée, atteint les cellules centrales.

L'*hypoderme*, les *trachées* contiennent quelquefois des corps globulaires. Les cellules infectées restent isolées. Dans le cas de l'hypoderme, elles sont dépourvues de pigments.

Les *tubes de Malpighi* des Orthoptères comprennent deux types de cellules, les cellules banales et les mucocytes (Martoja, 1959; Berkaloff, 1960). Ils sont, par ailleurs, constitués de plusieurs segments. L'infection est très tardive et ne concerne qu'un faible pourcentage d'individus; selon Seureau, elle peut être qualifiée d'accidentelle. Je n'ai pu l'observer que sur des individus de grande taille, à savoir une deutonymphe et quelques imagos. La contamination de l'organe est assurée par des cellules mobiles, des hémocytes, bourrés de rickettsies (pl. 19, fig. 8), qui souvent constituent de volumineux manchons autour des

Légendes de la planche

PLANCHE XVI

Rickettsiose des Gryllides (*G. bimaculatus*; *G. capitatus*).

Fig. 1, 2 et 3, Aspects histologiques de testicule d'imago sain (Azar, 400 diamètres). Remarquer, sur le cliché 1, le canal déférent intratesticulaire; sur le cliché 2, la paroi de la gonade (G), celle des tubes séminifères (S), et celle des cystes (C). Sur le cliché 3, la double paroi (tubes séminifères + cystes) apparaît (flèche). Remarquer l'absence quasi complète de tissu interstitiel.

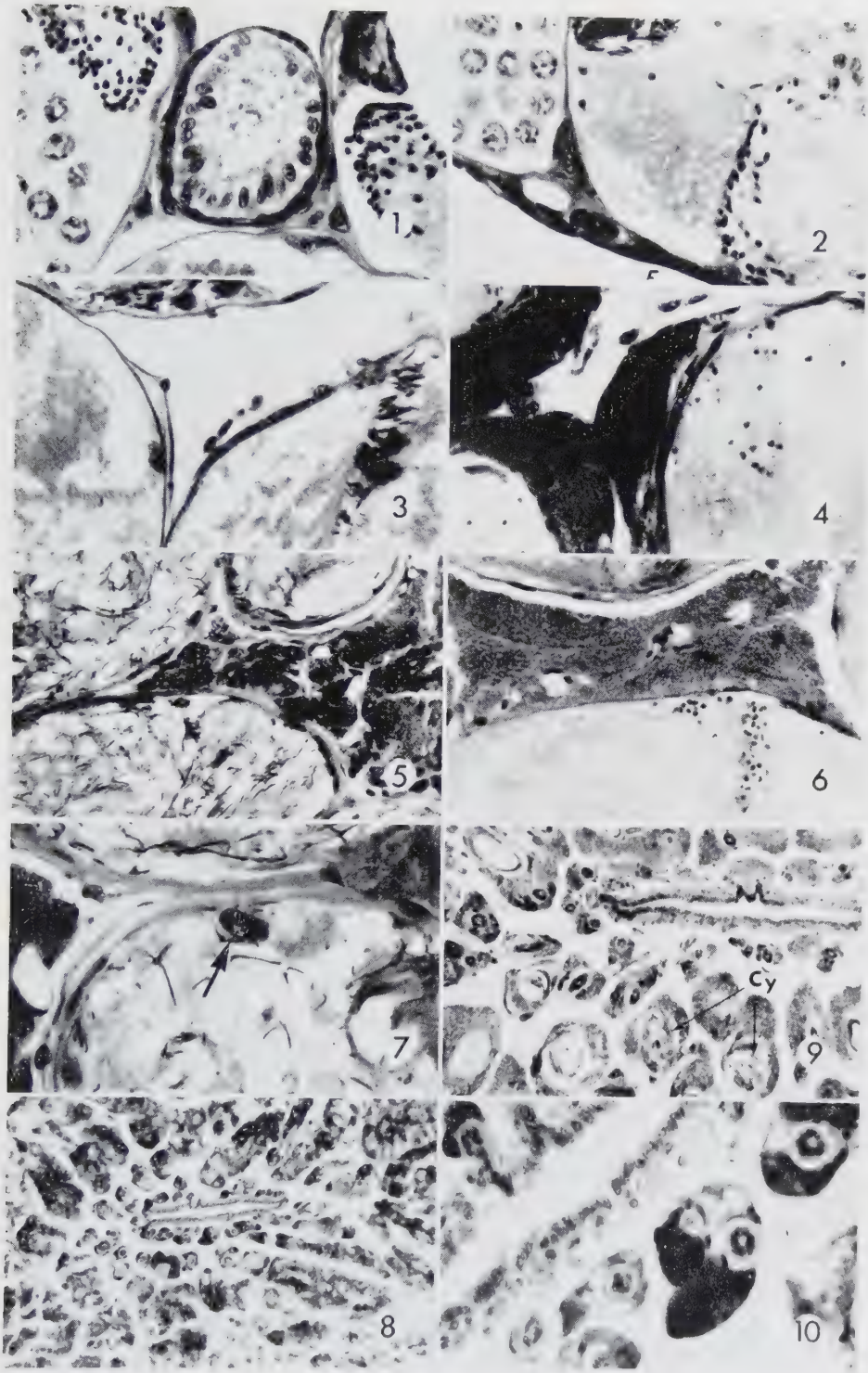
Fig. 4, Masses rickettsiennes (en noir) dans l'espace décollé situé entre la paroi des tubes et celle des cystes (méthode de Himes & Morrimer, 200 diamètres).

Fig. 5, Masses rickettsiennes ayant envahi complètement les espaces situés entre les cystes (Trichrome de R. y Cajal, 200 diamètres). Parmi les rickettsies, remarquer des cloisons, restes des parois des tubes.

Fig. 6, Détail des amas rickettsiens situés entre les cystes testiculaires (Trichrome de R. y Cajal, 200 diamètres). Remarquer les noyaux et les fragments de cloison (flèches) qui représentent des débris des parois des tubes séminifères.

Fig. 7, Début d'infection d'un cyste (Trichrome de R. y Cajal, 250 diamètres). Le foyer d'infection est signalé par une flèche.

Fig. 8, 9 et 10, État de dégradation plus avancé du testicule (Feulgen-picroindigo-carmin). Sur le cliché 8, donnant une vue d'ensemble de la plus grande partie de la gonade, seul le canal déférent apparaît nettement. Sur les clichés de détail 9 et 10, les foyers rickettsiens (en noir ou en gris) sont accolés à de petits canalicules ou à des cystes dégradés (Cy). On voit que l'épithélium du canal déférent est saint (30, 70 et 230 diamètres).


1
2
3
4
5
6
7
Cy
9
8
10

tubes de Malpighi. Cellules excrétrices et cellules muqueuses peuvent être envahies. Le premier signe de l'infection de la cellule excrétrice est représenté par un petit corps globulaire qui occupe la région apicale. Le nombre des corps globulaires augmente ensuite, et ils finissent par perdre leur individualité. Assez rapidement, les cellules se trouvent remplies par les germes, sans qu'il soit possible de noter une disparition progressive des constituants cytoplasmiques, comme pour les œnocytes. A ce stade de l'infection, les cellules contaminées sont isolées les unes des autres; le noyau est intact, mais la bordure en brosse n'est plus visible et il n'existe plus d'urosphérites. Les cellules voisines sont ensuite atteintes, et c'est alors un segment entier qui se trouve envahi. La lumière de ce segment disparaît, par suite de l'augmentation de volume des cellules (pl. 19, fig. 4 à 7), lié sans doute à la multiplication des germes. Les noyaux demeurent bien visibles, ainsi que les membranes cellulaires. Les lipides soudanophiles font leur apparition à ce stade. Enfin, le segment de tube, complètement envahi, s'incorpore au tissu opalescent.

Deux points doivent être soulignés. D'une part, la limite entre un segment sain et un segment envahi est d'une telle rigueur qu'une cellule complètement infectée est contiguë à une cellule saine. D'autre part, au moment où le fragment de tube contaminé est sur le point d'être incorporé au tissu opalescent, son diamètre est beaucoup plus élevé que celui des segments sains, et il y a un passage brutal entre des segments

Légendes de la planche

PLANCHE XVII

Rickettsiose chez les Gryllides (*G. bimaculatus; G. capitatus*).

Fig. 1 et 2, Détail du cliché 8, planche précédente (250 diamètres). Les rickettsies (en gris) entourent des cystes profondément dégradés, dans lesquels on reconnaît la paroi et des groupes de cellules germinales.

Fig. 3, Stade ultime de la dégradation du testicule (Bleu de toluidine, 70 diamètres). La gonade n'est plus qu'une culture rickettsienne, dans laquelle on distingue encore un canalicule.

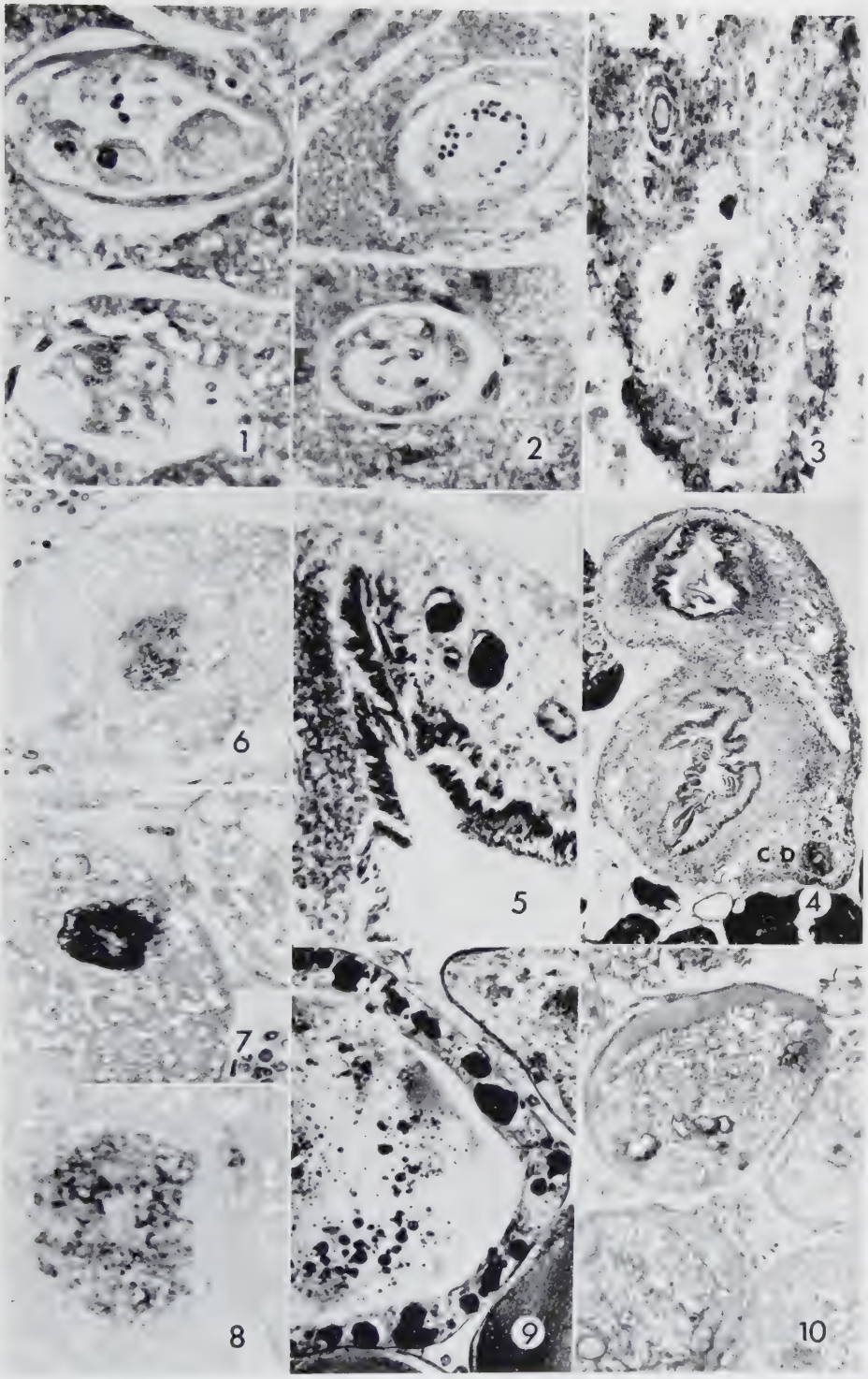
Fig. 4, Réservoir glandulaire (en coupe transversale) des tubes annexes mésodermiques, chez un imago mâle atteint de rickettsiose (Azan, 50 diamètres). Le réservoir, recourbé (d'où les deux sections) ne donne naissance à aucun des tubes glandulaires habituels (comparer avec la fig. 1, pl. 9). CD : canal déférent.

Fig. 5, Détail de la paroi du réservoir glandulaire, chez un imago mâle traité un mois par des antibiotiques (Trichrome de R. y Cajal, 140 diamètres). Remarquer les deux sections de tubes glandulaires, remplies d'une sécrétion fuchsinophile (en noir).

Fig. 6, 7 et 8, Vésicules germinatives d'oocytes en vitellogenèse (Feulgen, 350 et 850 diamètres). Remarquer l'aspect inhabituel de la vésicule germinative, et surtout la présence d'une chromatine donnant avec intensité la réaction de l'A.D.N.

Fig. 9, Couronne de cellules folliculeuses autour d'un oocyte en vitellogenèse (Trichrome de Millot, 330 diamètres). Remarquer le grand nombre de plaquettes vitellines dans les cellules folliculeuses.

Fig. 10, Début de la dégénérescence des oocytes en vitellogenèse (Feulgen-picroindigo carmin, 240 diamètres). Larges bandes, au contact de la gaine des ovarioles, résultant de la dégénérescence de vitellus et de cytoplasme.


1
2
3
6
5
C D
4
7
9
8
10

dont le diamètre n'est que de 60 μ (parties saines) et d'autres dont le diamètre est de 100 μ (parties infectées). Ces derniers subissent une métaplasie adipeuse.

L'infection de la *paroi du tube digestif* n'est jamais très importante. Au niveau du mésentéron, c'est le conjonctif sous-épithélial qui contient les foyers rickettsiens. Dans les segments dont les cellules épithéliales sont recouvertes d'une intima, ce sont les cellules épithéliales elles-mêmes qui contiennent les germes. Le plus fréquemment, ce sont les cellules à glycogène de la valvule proctodéale, ainsi que les papilles de l'iléon et l'uretère (pl. 19, fig. 1), plus rarement l'épithélium du gésier, qui sont infectés.

Indépendamment de l'infection des cellules, la maladie provoque des troubles secondaires, qui consistent en modifications morphologiques de la paroi. Tantôt, la musculeuse présente de grosses tumeurs (tumeurs histiocytaires), tantôt la paroi du proctodeum s'épaissit considérablement. Dans la paroi de l'iléon et de l'ampoule rectale, notamment, l'épaisseur de la cuticule passe de 3 μ chez l'imago sain à 150 μ chez le malade (pl. 19, fig. 2). Sous les épaississements cuticulaires, fortement pigmentés, l'épithélium est constitué de volumineuses cellules à noyau géant (tumeurs épithéliales). Très souvent, des filaments mycéliens s'insinuent dans ces sortes de tumeurs. D'autres aspects pathologiques, assez fréquents, concernent les papilles de l'iléon : le long des aiguilles chitineuses apparaissent des dépôts brun-noir, qui diffèrent des urates, des mélan nes ou des chromolipoïdes. Ils correspondent en tous points à des dépôts de même aspect décrits dans les papilles de la chambre à fermentation du Coléoptère *Oryctes sp.* atteint d'une « atrophy disease » (Marchall, 1962). Sans doute, chez les grillons malades comme chez les Coléoptères, ces dépôts ont-ils pour origine une altération de la flore bactérienne de l'iléon. C'est peut être à cette altération qu'on pourrait rapporter certains aspects aberrants et inconstants de la flore du segment à villosités, chez *G. capitatus :* la densité microbienne est anormalement faible, et la flore n'est représentée que par des formes nucléées.

Le *système neuro-endocrine* est toujours infecté, mais les foyers rickettsiens restent peu nombreux dans le système nerveux proprement dit. Aucun corps globulaire n'a été observé dans le cerveau. Il en existe parfois dans les ganglions ou dans les connectifs de la chaîne ventrale, et c'est surtout le dernier ganglion abdominal qui est le plus atteint. (pl. 15, fig. 9). L'infection commence vraisemblablement dans l'épinèvre, si l'on en juge par la fréquence des foyers rickettsiens dans ce tissu (pl. 15, fig. 8). Dans les ganglions nerveux, les corps globulaires se développent dans le cytoplasme des neurones. Dans les connectifs comme dans les nerfs, on les trouve disséminés entre les fibres. Le *corpus cardiacum* contient de nombreux foyers rickettsiens, mais l'organe n'est jamais totalement envahi (pl. 19, fig. 3). L'évolution est la même pour la glande prothoracique des nymphes ou des larves. Par contre, les *corpora allata* restent indemnes.

L'*appareil génital femelle* comprend les ovaires, les voies génitales (oviductes latéraux, oviducte commun et vagin), la spermathèque et les

glandes annexes de la chambre périvulvaire. Il n'en existe aucune description histologique récente, les données d'Echard (1962) sur les gonades des larves de *G. domesticus*, celles de Bræsch (1950) sur les glandes annexes étant strictement morphologiques. Chez l'imago sexuellement mûr, les ovaires occupent un volume considérable dans l'abdomen. Le nombre des œufs mûrs est élevé, et l'abondance du vitellus confère aux ovarioles une couleur jaune vif. Chez l'imago malade, les *ovaires* sont le plus souvent invisibles à l'examen anatomique; parfois cependant, il est possible de reconnaître des ovarioles de taille réduite quand les oocytes contiennent un peu de vitellus. L'étude histologique confirme que les glandes génitales restent d'une taille très réduite, qui n'excède que rarement celle des ovaires des nymphes. La gonade est pourtant toujours bien individualisée, sa paroi restant très visible. Entre les ovarioles, bien séparés les uns des autres, il existe de nombreuses cellules libres, fusiformes, qui sont très rares chez les grillons sains. Il s'agit sans doute d'éléments figurés de l'hémolymphe, et la plupart sont remplis de rickettsies. Les ovarioles ne présentent pas de signes d'infection; les rickettsies ne se développent pas dans les oocytes. Le germarium a un aspect normal, les oocytes y subissent leur début de grand accroissement sans manifester d'altérations. Les perturbations affectent seulement la région la plus proche du vitellarium, ainsi que le vitellarium lui-même. Dans ces segments, certains ovarioles sont entourés par des manchons cellulaires, sortes de « kystes », dont les éléments proviennent sans doute de la paroi des gonades et restent en relation avec elle (pl. 18, fig. 8 et 9). Certaines cellules de ces kystes sont remplies de rickettsies, mais ces cellules infectées ne sont jamais nombreuses (pl. 18, fig. 5). A l'intérieur de chaque ovariole, et indépendamment de l'existence de ces kystes, la couche des cellules folliculeuses et les oocytes subissent des modifications importantes, bien que les rickettsies n'y pénètrent pas. Les cellules folliculeuses manquent complètement à certains niveaux (pl. 17, fig. 6, 7 et 10), les cellules germinales se trouvent alors au contact de la gaine de l'ovariole. A d'autres niveaux, les cellules folliculeuses se multiplient, jusqu'à former une très épaisse couronne autour des oocytes (pl. 18, fig. 3). Ailleurs, elles gardent leur disposition normale en couche simple, mais la couche qu'elles forment est irrégulière et on n'y observe pas les cellules à noyau bilobé si caractéristiques de l'imago sain (Conklin, 1903). Même lorsque ces cellules gardent un aspect et une disposition proche de la normale, leur activité est perturbée. Il apparaît, dans leur cytoplasme, en même temps que dans celui de l'oocyte qu'elles entourent, de volumineux granules qui présentent les mêmes caractères histochimiques que le vitellus des Gryllides (présence de glycoprotides A.P.S.-positifs, d'α-amino-acides, d'amino-acides phénoliques et sulfhydrilés), mais qui, de plus, sont métachromatiques (pl. 17, fig. 9). La présence de vitellus, dans les cellules folliculeuses, peut être interprétée de 2 façons : ou bien il s'agit de granules élaborés *in situ*, ou bien ils représentent des produits de résorption du vitellus des oocytes. La première hypothèse semble la plus plausible, car le vitellus des cellules folliculeuses apparaît au moment où la cellule germinale du

follicule ne se trouve qu'en début de vitellogenèse. L'élaboration de vitellus par ces cellules est à la fois fréquent et important par le grand nombre des cellules qu'elle intéresse. Qu'elles élaborent ou non des plaquettes vitellines, les cellules folliculeuses sont, par ailleurs, incapables d'assurer la sécrétion du chorion des oocytes. Dans ces derniers, la vitellogenèse est si profondément perturbée, qu'aucune cellule germinale ne parvient à maturité. Tandis qu'au cours d'une vitellogenèse normale, la vésicule germinale est bien individualisée, et que les chromosomes ne donnent plus les réactions de l'A.D.N., les noyaux des oocytes des grillons malades, ont souvent un aspect aberrant, au moins chez *G. capitatus :* ils ne possèdent plus de membrane; les chromosomes, filamenteux ou en forme de mottes, donnant intensément les réactions nucléales (pl. 17, fig. 6, 7 et 8), sont groupés en une ou plusieurs volumineuses masses dans le cytoplasme même de l'oocyte. Il y a élaboration de vitellus, mais, dès que les plaquettes deviennent nombreuses, les oocytes dégénèrent et les plaquettes sont détruites. La lyse intéresse d'abord le cytoplasme des cellules en vitellogenèse aussi bien que de celles qui sont parvenues à la fin du stade de grand accroissement. Elle se traduit par l'apparition, à la périphérie des cellules sexuelles, plus rarement au centre, de larges « bandes » (pl. 17, fig. 10), remplies d'un matériel fortement métachromatique (γ), tanophile, A.P.S.-positif, colorable par le bleu alcian et donnant les réactions des groupements —SH. Dans les oocytes en vitellogenèse, les plaquettes, comme celles des grillons sains, sont riches en aminoacides sulfhydrilés et phénoliques, en glycoprotides; mais elles donnent,

Légendes de la planche

PLANCHE 18

Rickettsiose chez les Gryllides (*G. bimaculatus*, *G. capitatus*).

Fig. 1, 2, 3, 4 et 6, Divers aspects de l'atrésie des follicules (Acide periodique-Schiff-hémalun-jaune de Mars) :

1 : 150 diamètres. Remarquer, à gauche, l'anneau A.P.S.-positif provenant de la lyse du cytoplasme; à droite, l'amas de cellules folliculeuses.

2 : 160 diamètres. Remarquer la couche irrégulière des cellules folliculeuses, et le début de lyse des plaquettes vitellines.

3 : 140 diamètres. L'oocyte est remplacé par un bouchon cellulaire.

4 : 120 diamètres. Dégénérescence du cytoplasme et du vitellus.

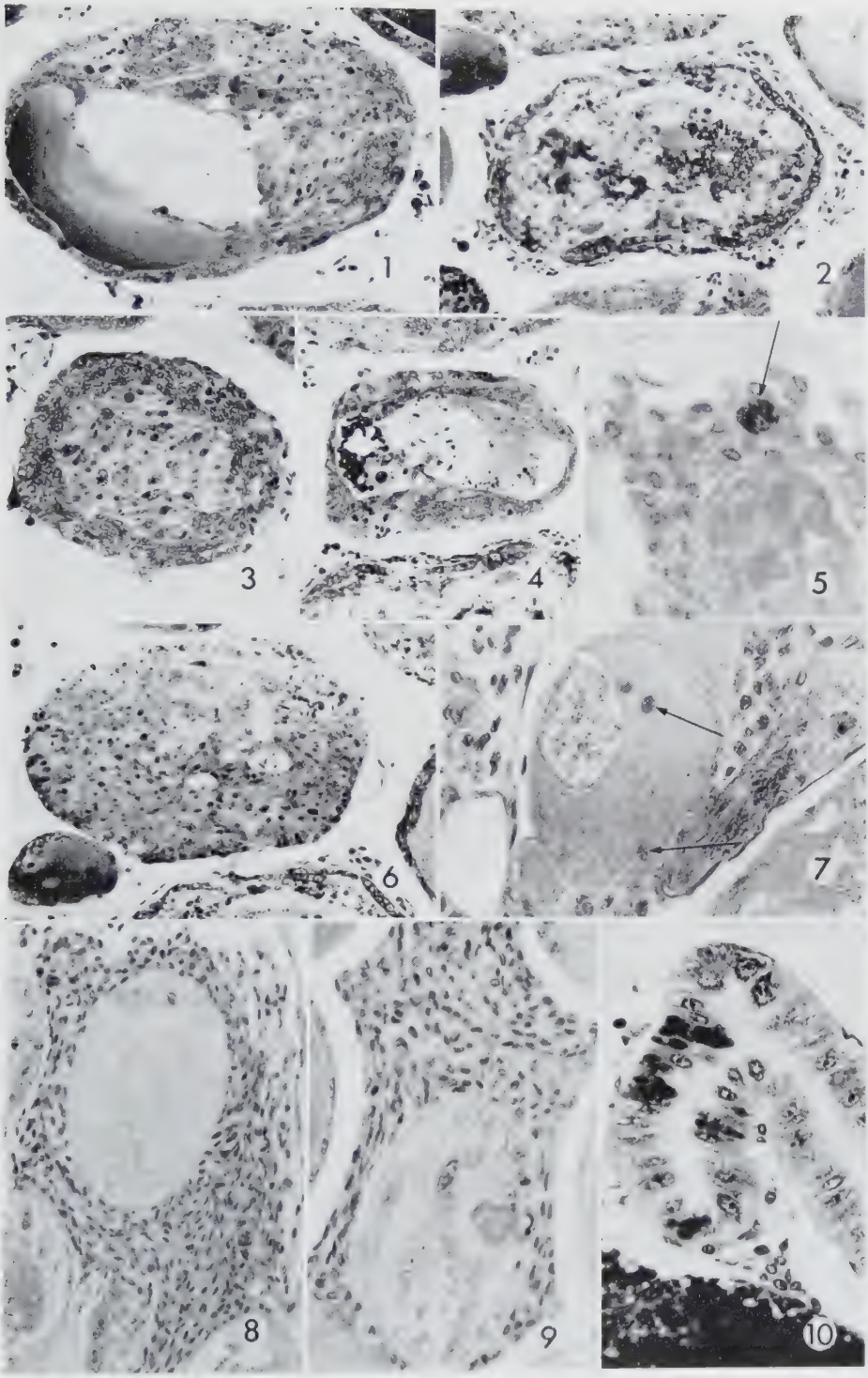
6 : 150 diamètres. Même aspect que pour le cliché 3, mais la couche des cellules folliculeuses est presque absente.

Fig. 5, Amas rickettsien dans une cellule d'un kyste entourant un oocyte (Réaction nucléale de Feulgen, 300 diamètres).

Fig. 7, Corps globulaires (flèches) dans le cytoplasme d'un oocyte (Réaction nucléale de Feulgen, 250 diamètres). Préparation et cliché Seureau.

Fig. 8 et 9, Kystes autour de follicules en dégénérescence (Bleu de toluidine, 160 diamètres).

Fig. 10, Fragment de glande annexe de la chambre périvulvaire (Hémalun-picroindigocarmin, 140 diamètres). Certaines cellules épithéliales, en noir, sont complètement envahies.


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

en plus, les réactions des mucopolysaccharides acides (métachromasie γ, colorabilité par le bleu alcian), alors que les mucopolysaccharides acides ne sont décelables, dans le vitellus des grillons sains, qu'après démasquage par la pepsine ou par la trypsine. Dégradation du vitellus et lyse du cytoplasme contribuent sans doute à la formation des « bandes de dégénérescence ». Il se peut aussi que les cellules folliculeuses y participent également, car ces bandes sont souvent situées dans les régions de la cellule germinale contiguë à la gaine de l'ovariole (pl. 17, fig. 10). Quoi qu'il en soit, les mucopolysaccharides acides contenus dans les bandes de dégénérescence et dans les plaquettes vitellines représentent le résultat d'une métaplasie muqueuse. Il existe un autre aspect très fréquent de la dégénérescence des cellules sexuelles, qui se rencontre dans les segments de l'ovariole d'où les cellules folliculeuses n'ont pas disparu. Celles-ci se multiplient au point d'envahir l'oocyte, qu'il s'agisse d'une cellule en cours de vitellogenèse, ou bien d'un oocyte n'ayant pas encore commencé l'élaboration des plaquettes vitellines. Certaines des plaquettes se trouvent incorporées dans les cellules en prolifération; d'autres, très dégradées,

Légendes de la planche

PLANCHE 19

Rickettsiose chez les Gryllides (*G. bimaculatus*).

Fig. 1, Papille de l'iléon (Réaction nucléale de Feulgen, 300 diamètres). Remarquer les foyers rickettsiens (en noir) dans certaines cellules épithéliales. B : bactéries de la flore intestinale.

Fig. 2, Tumeur de la paroi de l'iléon (Trichrome de R. y Cajal, 65 diamètres). M : musculeuse; L : lumière. Remarquer l'épaississement considérable de l'intima, pigmentée (noir) à sa base.

Fig. 3, Fragment de *corpus cardiacum* (Trichrome de R. y Cajal, 400 diamètres). VD : vaisseau dorsal. Remarquer les foyers rickettsiens (en noir).

Fig. 4, 5, 6 et 7, Infection des tubes de Malpighi :

4 : Réaction nucléale de Feulgen, 500 diamètres. Remarquer la grande plage à rickettsies (en noir).

5 : Bleu de toluidine, 200 diamètres. Remarquer le passage brutal entre un segment sain (en bas) et un segment complètement infecté (en haut); ce dernier est accolé au tissu opalescent, auquel il s'incorpore.

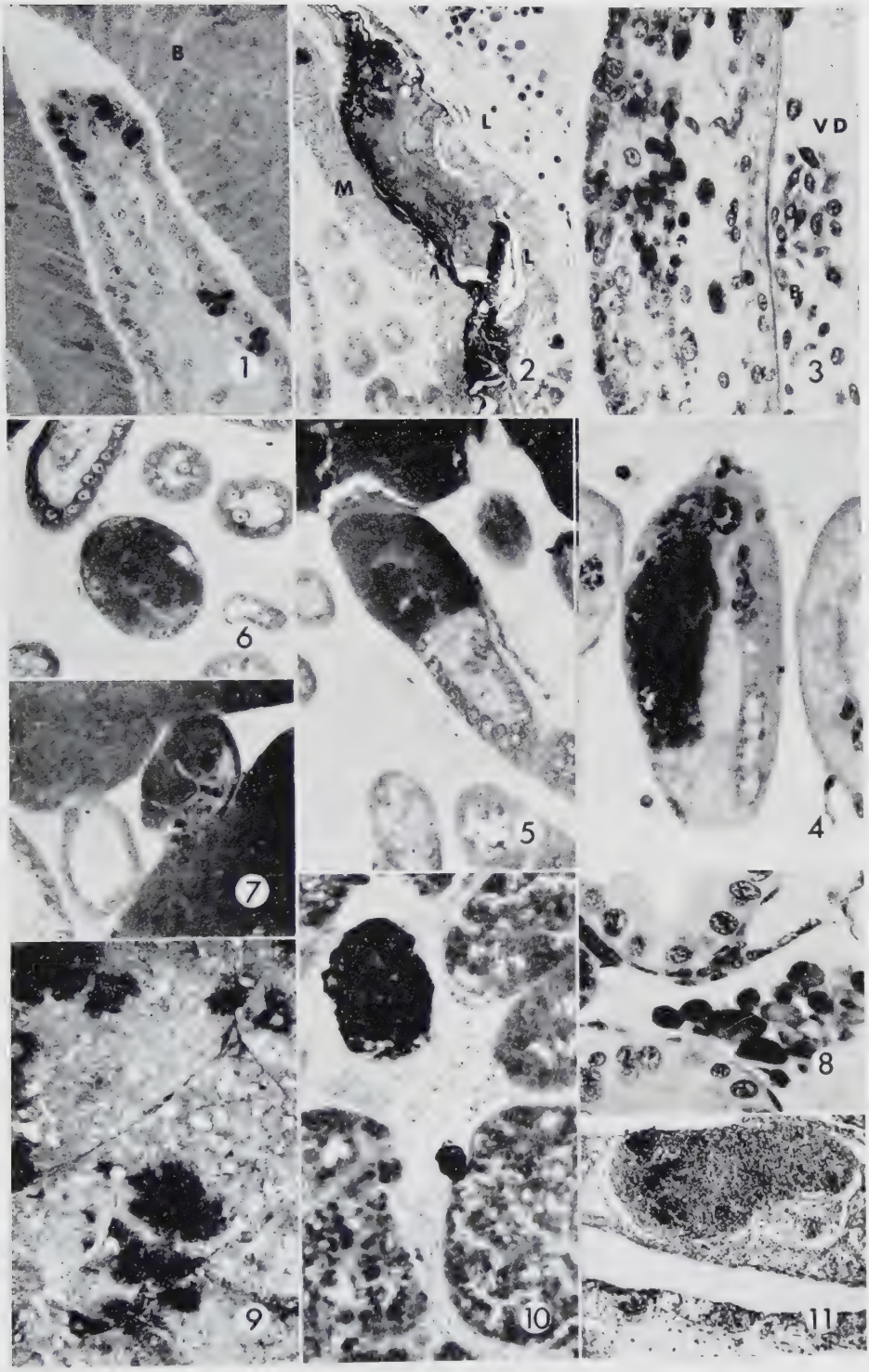
6 et 7 : Bleu de toluidine. Segments de tubes complètement infectés. Remarquer la disparition de la lumière, et, sur le cliché 7, l'accolement au tissu opalescent.

Fig. 8, Hémocytes chargés de rickettsies (en noir), circulant entre les tubes de Malpighi sains (Réaction nucléale de Feulgen, 350 diamètres).

Fig. 9, Tissu opalescent (Acide periodique-Schiff, jaune de Mars, 200 diamètres). Remarquer les plages de glycoprotides (en noir) et, parmi les rickettsies (en gris), quelques granules de glycogène.

Fig. 10, Nodules mélanisés (Hexaméthylène-tétramine d'argent-hémalun, 300 diamètres). Remarquer le pouvoir réducteur élevé des nodules, et les cellules qui les entourent.

Fig. 11, Massifs hémocytaires et nodules persistant chez un Grillon guéri par les antibiotiques (Trichrome de R. y Cajal, 40 diamètres).


B
1
L
M
L
2
VD
B
3
6
5
4
7
8
9
10
11

sont refoulées, en même temps que le cytoplasme de l'oocyte, à un pôle des follicules et disparaissent peu à peu (pl. 18, fig. 1). Ce processus conduit à la formation de follicules atrétiques, sortes de bouchons cellulaires très denses (pl. 18, fig. 2, 3 et 6). Des kystes, analogues à ceux qui ont été décrits précédemment, les entourent souvent.

Les dégradations que subissent les cellules germinales et les cellules qui leur sont associées sont donc considérables, bien que la gonade ne soit pas envahie par les germes. Un seul exemple d'oocyte présentant des corps globulaires a été décrit (Seureau, 1965); compte tenu du très grand nombre d'ovaires examinés, cet aspect doit représenter une exception (pl. 18, fig. 7). Les seules cellules intra-ovariennes qui contiennent des rickettsies de façon très courante, sont les hémocytes et les cellules des kystes. Elles ne peuvent causer, à elles seules, les altérations de l'activité ovarienne. Néanmoins, la rickettsiose entraîne la dégénérescence des cellules sexuelles.

Les *voies génitales femelles* sont exemptes de germes, de même que la *spermathèque* et son canal. La spermathèque est toujours remplie de spermatozoïdes. Mais les *glandes annexes* de la chambre périvulvaire sont atteintes. Leurs cellules ectodermiques, formant un épithélium simple recouvert d'une intima chitineuse, présentent de nombreux corps globulaires (pl. 18, fig. 10), dont l'évolution est comparable à ceux des tubes de Malpighi. L'augmentation du volume des plages rickettsiennes dans les cellules provoquent les déformations des noyaux (fig. 13). Bien

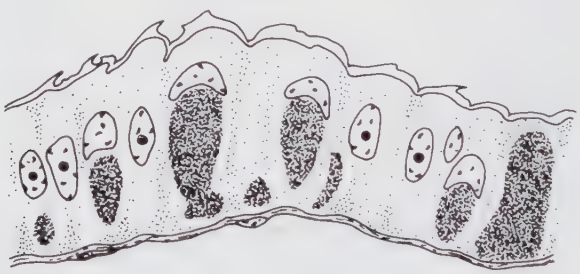


Fig. 13, Évolution de la pathogenèse dans l'épithélium des glandes annexes de la chambre périvulvaire de *G. bimaculatus*.
Remarquer les déformations nucléaires provoquées par les foyers rickettsiens (en grisé).

que les voies génitales ne contiennent jamais d'œufs, il existe quelques sécrétions, notamment dans les oviductes latéraux.

Au dernier stade de l'infection de chaque tissu, les cellules dégénérées d'origine diverse s'agglomèrent en un tissu blanchâtre, le *tissu opalescent*, défini plus haut. Il possède à la fois un certain nombre de caractères qui lui sont propres, et aussi certains caractères des tissus qui lui ont donné naissance. Parmi ces derniers, se situent les noyaux de forme et de taille très variées, et qui peuvent être assez facilement rapportés au corps gras,

aux oenocytes, aux cellules salivaires, aux tubes de Malpighi dégénérés. Ce sont aussi des granules de glycogène, tirant leur origine du corps gras, ou bien des plages de ribonucléines provenant de divers tissus (oenocytes surtout), ou encore des globules lipidiques hérités du corps gras. Mais le tissu opalescent tire son originalité de sa très grande compacité, anormale pour les tissus d'Insectes (pl. 14, fig. 1 et 2), et lié au fait qu'il ne représente qu'une vaste culture microbienne. Les germes lui confèrent tous les caractères histochimiques qui leur sont propres, et qui ont été énumérés plus haut. Mais, de plus, il existe certains composés inhabituels quant à leur nature ou à leur concentration. Ce sont d'abord des lipides soudanophiles, beaucoup trop abondants pour ne provenir que du corps gras dégénéré. Etant donné que les lipides soudanophiles apparaissent, à la fin de la pathogenèse, dans certains organes qui n'en contiennent pas habituellement (glandes salivaires, tubes de Malpighi), il est probable que l'abondance des globules lipidiques du tissu opalescent est l'un des aspects de la métaplasie adipeuse qui affecte tous les organes. En second lieu, il apparaît des composés APS-positifs, qui sont soit diffus dans le tissu, soit plus souvent concentrés au niveau de certaines plages situées au voisinage des lacunes d'hémolymphe (pl. 19, fig. 9), qui d'ailleurs, contient les mêmes composés. Il s'agit de mucopolysaccharides acides et surtout de glycoprotides. Il existe aussi assez souvent, dans le tissu opalescent, des formations sphériques, de très faible diamètre (5 μ), dont la couleur naturelle varie du jaune au brun foncé. Elles résultent de l'agglomération, autour de foyers rickettsiens, de cellules fusiformes, dont l'origine est sans doute hémocytaire. Les pigments, appartenant au groupe des mélanines, se déposent parmi ces cellules. L'aspect morphologique de ces corps pigmentés rappelle celui des « pseudo-tumeurs » de la Drosophile (Stark, 1919), celui des « black bodies » des Phasmes (Salt, 1956-1961). Ils seront appelés ici « nodules » (pl. 19, fig. 10).

En résumé, l'examen histopathologique des grillons atteints de la rickettsiose révèle une dégradation considérable de nombreux organes, qu'ils soient envahis ou non par les rickettsies. Certains caractères sexuels secondaires internes, mâles ou femelles, ne peuvent se différencier. Au terme de la pathogenèse, une grande partie des tissus subit une métaplasie adipeuse, puis se trouve remplacée par le tissu opalescent, sorte de culture microbienne. La quantité de germes existant dans l'organisme est alors considérable. On peut l'évaluer à 200 à 300 mg chez un imago, soit 1/5 ou 1/4 du poids du corps.

V. — Développement de la rickettsiose chez Gryllus État moyen des insectes contaminés

Les données de Seureau (1965), obtenues par examen histologique de grillons contaminés expérimentalement à un stade précis de leur vie, et maintenus ensuite à l'abri d'une nouvelle contamination, montrent que les caractères histopathologiques énumérés précédemment corres-

pondent à un degré extrême de développement de la rickettsiose. Ce degré ne peut être réalisé par une contamination unique, même si elle intervient au début de la vie larvaire. Dans ces conditions expérimentales, le corps gras est l'organe qui est atteint en premier lieu, puis ce sont les testicules, les œnocytes, les glandes salivaires, enfin le système neuro-endocrine qui sont envahis. Une forte mortalité survient un mois après la contamination, lorsque le tissu adipeux est totalement envahi. Toutefois, certains Insectes résistent mieux que d'autres et parviennent à l'état imaginal, sans jamais présenter de degré de contamination aussi avancé que celui que j'ai décrit précédemment : les tubes de Malpighi par exemple, sont sains; les glandes annexes de l'appareil génital mâle sont différenciées et fonctionnelles, bien que la gonade soit dégradée; il n'existe que rarement des nodules mélanisés. Si la contamination est effectuée au stade nymphal, les désordres histologiques sont moins importants, les nodules manquent, les femelles sont stériles. Pour une contamination encore plus tardive (jeune imago), seul le tissu adipeux est atteint, sans formation de nodules; les grillons sont tous féconds.

Donc, chez les grillons qui n'ingèrent qu'une seule fois des germes, fussent-ils en grand nombre, le degré d'infection des organes ou les conséquences de cette infection, sont moins grands que chez ceux qui proviennent des élevages où sévit l'épizootie. La gravité de la maladie chez les individus groupés tient certainement aux conditions d'élevage : dans les terrariums contaminés, les grillons se trouvent constamment au contact des germes; le cannibalisme, la nécrophagie contribuent au renouvellement de la contamination. Quelles que soient les conditions de vie, certains individus sont plus réfractaires à l'infection; chez eux, les symptômes morphologiques de la maladie apparaissent mal. Il en est d'autres, au contraire, pour qui les désordres histologiques peuvent atteindre un degré exceptionnel avant que la mort ne survienne. C'est cet état extrême que j'ai décrit dans le chapitre précédent.

Les différences entre l'état de dégradation des Insectes groupés et infestés fréquemment, et l'état de ceux qui sont isolés et n'ingèrent qu'un ou deux repas contaminés, est un point dont il faut tenir compte dans l'étude de la contamination expérimentale d'autres Orthoptères.

ESSAI DE CONTAMINATION EXPÉRIMENTALE DANS DIVERS GROUPES D'ORTHOPTÈRES

Certains travaux relatifs à la rickettsiose de *Melolontha melolontha* (Krieg, 1958; Hurpin, 1960) et à celle de *Popillia japonica* (Dutky & Gooden, 1952) ont montré l'absence de spécificité du germe à l'égard de divers hôtes appartenant au même ordre d'Insectes. Il paraissait donc nécessaire d'envisager les possibilités de transmission de la rickettsiose à divers représentants de l'ordre des Orthoptères.

Le protocole expérimental est identique dans tous les cas. L'infestation est réalisée *per os*. Un aliment (salade pour les *Grylloidea* et les *Tettigonoidea*, germinations de

blé ou feuilles de *Poa* pour les *Acridoidea*) est contaminé par trempage dans une solution très dense de rickettsies; celle-ci est obtenue par broyage, dans du sérum physiologique, de tissu opalescent prélevé sur *G. capitatus*. L'aliment contaminé est présenté deux jours de suite. Des Insectes témoins provenant d'une même ponte ou d'une même récolte, maintenus à l'abri des rickettsies, sont élevés dans des conditions analogues, à la température de 22 à 25 °C.

I. — Contamination expérimentale des Grylloidea

Chez les *Nemobiinae*, les imagos des deux sexes de *Nemobius sylvestris* sont sensibles à la rickettsiose. Les images histopathologiques sont les mêmes que pour les *Gryllus* contaminés à l'état imaginal.

Chez les *Gryllotalpidae*, la contamination n'a pu être réalisée que sur des nymphes de sexe mâle. Les Insectes sont morts 12 semaines environ après l'ingestion des germes, sans avoir présenté les symptômes caractéristiques. Le *corps gras* est presque complètement envahi, les lobes restant toujours bien individualisés. Les *testicules* comportent, entre les tubes séminifères, de très importants foyers rickettsiens. Un grand nombre de *cellules péricardiales* sont contaminées. Les autres organes sont sains, notamment les glandes annexes de l'appareil génital, qui sont remplies d'abondantes sécrétions, d'aspect habituel.

L'aspect le plus caractéristique de la rickettsiose des courtilières est la mélanisation très importante des tissus contaminés et de certains autres tissus non envahis par les germes. Dans les organes contaminés, surtout au niveau du corps gras, il apparaît de volumineux agrégats de nodules, dont le centre renferme des foyers rickettsiens, et dont la périphérie est constituée de couronnes d'hémocytes. Dans les tubes séminifères, restés sains, la paroi épaisse contient aussi des alignements de nodules. De plus, il se produit, dans les cystes qui contiennent des spermatozoïdes, une mélanisation de ceux-ci : les têtes conservent les caractères histochimiques de l'A.D.N., mais les flagelles sont intensément pigmentés en jaune-brun par des dérivés phénoliques réduisant l'héxaméthylène-tétramine d'argent. Il s'agit là d'un cas de dégénérescence des cellules sexuelles. Jamais les spermatozoïdes, mélanisés ou non, ne descendent dans les voies génitales. Il en résulte que les courtilières, qui sont pourtant aptes à sécréter un spermatophore, restent stériles.

En conclusion, plusieurs Orthoptères du groupe des *Grylloidea* peuvent être atteints par la rickettsiose, à n'importe quel stade de leur vie. Si l'on peut généraliser à l'ensemble du groupe les résultats obtenus chez *Gryllus*, où les observations ont été les plus nombreuses, on peut penser que les désordres histologiques dépendent à la fois du stade de contamination et de la fréquence d'ingestion des germes.

II. — Contamination expérimentale des Tettigonioidea

Chez *Tettigonia viridissima*, la contamination a pu être réalisée sur de jeunes larves de premier ou de deuxième stade, sur des nymphes et sur

des imagos. Pour les autres espèces envisagées (*Conocephalus fuscus*, *Phaneroptera falcata*, *Leptophyes punctatissima*, *Decticus verrucivorus*, *Metrioptera roeseli*, *Pholidoptera griseoaptera*, *Platycleis tessellata*, *P. grisea*, *Ephippiger ephippiger*), l'infection n'a pu être tentée que sur des nymphes ou sur des imagos. Sur 42 animaux de ces 9 dernières espèces, un seul individu, une femelle appartenant à l'espèce *Pholidoptera griseoaptera*, a contracté la rickettsiose; cinq semaines après la contamination, au stade nymphal, l'Insecte, devenu imago, ne présentait de corps globulaires que dans le corps gras; sa vitellogénèse était normale.

L'espèce qui s'est avérée la plus sensible à l'infection est la Sauterelle verte, *Tettigonia viridissima*. Lorsque les sauterelles sont contaminées au cours des premiers stades de leur vie larvaire, 70 % d'entre elles sont atteintes. Chez les malades, le développement larvaire n'est pas retardé de façon sensible; la mortalité est aussi faible que chez les témoins; aucun symptôme morphologique n'apparaît. Le comportement sexuel reste normal dans les deux sexes. Si la contamination est effectuée au stade nymphal ou imaginal, les germes ingérés ne provoquent plus la rickettsiose. L'énumération des principaux désordres histologiques ne peut donc être envisagée qu'à propos des Insectes infectés à un stade précoce.

Deux semaines après l'infection, il n'existe de corps globulaires que dans le corps gras. L'étude histologique doit donc être réalisée de préférence au moment de la mue imaginale, ou après celle-ci; dans ces conditions, les sauterelles sont examinées au cours de la septième semaine qui suit la contamination.

Comme chez les grillons, c'est le *corps gras* qui est le plus intensément dégradé. L'aspect en est très différent selon que l'Insecte est fixé au moment de la mue imaginale, ou plus tardivement, et ceci en raison des modifications importantes que subit ce tissu au début de la vie imaginale (Martoja & Lauverjat, 1965). A la mue, en effet, la teneur en urates est très grande, puis elle diminue au point qu'une ou deux semaines plus tard, les cellules à urates sont très dispersées et d'assez petite taille. Celles-ci ne contiennent que des amas rickettsiens assez petits; clairsemés dans les travées cytoplasmiques au début de l'infection de ces cellules (pl. 21, fig. 5), ils envahissent ensuite tout le cytoplasme et seuls le noyau et les granules d'urates persistent. Les cellules adipeuses subissent la même évolution que chez les grillons malades : les corps globulaires finissent par confluer pour occuper tout l'espace cytoplasmique. Chez les *Tettigonia* malades fixées à la mue imaginale, les plages infectées paraissent très réduites, alors qu'elles sont beaucoup plus développées quand l'imago est plus âgé, ce qui est surtout lié à la régression normale des cellules à urates (pl. 21, fig. 6). Il n'existe que quelques nodules pigmentés, de petite taille. Les *œnocytes* sont infectés, et leur nombre est restreint. Dans le *tégument*, quelques cellules contiennent des foyers rickettsiens (pl. 21, fig. 9). Les *glandes salivaires*, les *cellules péricardiales* contiennent un pourcentage élevé de cellules envahies (pl. 21, fig. 7 et 8). Les *testicules* sont contaminés, mais seuls les espaces situés entre les tubes séminifères

hébergent des rickettsies. Alors qu'à la mue imaginale, le tissu interstitiel est très développé chez les témoins (pl. 22, fig. 1), il manque complètement chez les malades. A sa place, il n'existe que des plages à rickettsies (pl. 22, fig. 2). Les cystes sont indemnes et la spermatogenèse s'y déroule normalement, quoique avec un certain retard, puisqu'à ce stade, il n'existe pas encore de spermatozoïdes. Aucun des tubes glandulaires des *annexes mésodermiques* n'est différencié (pl. 22, fig. 3 et 4). Il s'ensuit que les mâles sont incapables d'élaborer leurs spermatophores. Chez les femelles, les *ovaires*, encore invisibles à l'examen anatomique 18 jours après la mue imaginale, sont profondément dégradés et envahis par les germes. Pour l'ensemble des gonades, il ne subsiste que 4 ou 5 ovarioles, ou fragments d'ovarioles, sains (pl. 22, fig. 5), inclus dans un ensemble de cordons parallèles, dont la disposition est celle des anciens tubes ovariens, et qui, notamment, prennent attache sur un filament antérieur commun. Chaque cordon est constitué d'un alignement de plages à rickettsies, entourées chacune d'une couronne de cellules saines; cette disposition résulte sans doute d'une infection des cellules germinales, qui se trouvent peu à peu remplacées par un amas de rickettsies, les cellules folliculeuses restant saines plus longtemps (pl. 22, fig. 6 et 7). La petite taille des follicules entourant un foyer rickettsien laisse penser que l'infection des oocytes est réalisée avant la phase de grand accroissement. Dans les segments d'ovarioles non envahis, la vitellogenèse s'ébauche. En même temps, les cellules folliculeuses se multiplient pour constituer une enveloppe épaisse et stratifiée autour des oocytes les plus volumineux (pl. 22, fig.8). La quantité de vitellus élaboré est toujours faible, et la lyse des plaquettes et du cytoplasme a lieu aussitôt après. Il apparaît alors, dans l'oocyte, des mucopolysaccharides acides, métachromatiques et intensément colorables par le bleu alcian. Ces composés n'existent jamais, à l'état libre, dans le vitellus des *Tettigonioidea* sains, où il n'est possible de les mettre en évidence qu'après démasquage par des enzymes protéolytiques. Les cellules germinales des sauterelles malades, au terme de leur évolution, subissent donc une métaplasie muqueuse; elles sont ensuite envahies par les cellules folliculeuses (pl. 22, fig. 9). Les *voies génitales* mésodermiques restent saines. Le canal de la spermathèque et la *spermathèque* elle-même, contiennent dans leur épithélium, de nombreuses plages rickettsiennes. Néanmoins, la fonction de l'organe n'est pas perturbée, puisque la lumière de la spermathèque est remplie de spermatozoïdes. Les femelles malades sont toujours stériles; cette stérilité a pour cause, non une absence de fécondation, mais une dégénérescence des oocytes susceptibles d'être pondus. La paroi du *tube digestif*, le *système nerveux*, le *système excréteur* sont sains. Pour ces derniers, il y a coexistence, à la mue imaginale, de tubes fonctionnels et de tubes en voie de croissance et de différenciation. Tous les organes infectés gardent leur individualité : il ne se constitue pas de tissu opalescent.

En conclusion, la contamination de *Tettigonia viridissima* n'est possible qu'au stade des jeunes larves. Si l'on généralise aux autres Ensi-

fères de ce groupe les résultats obtenus pour une espèce, on peut interpréter les échecs dans l'infection des neuf autres espèces, comme la conséquence d'une tentative réalisée sur des Insectes trop âgés. Pour toutes les espèces, la contamination des nymphes ou des imagos ne doit concerner qu'un très petit nombre d'individus.

Le corps gras est l'organe qui est envahi en premier lieu, et qui est ensuite le plus profondément modifié; mais il ne renferme que très peu de nodules. Dans les deux sexes, les imagos sont stériles : les mâles par suite de l'absence de glandes annexes, les femelles par suite d'une destruction de la plupart des ovarioles et d'une dégénérescence des oocytes des ovarioles non contaminés.

III. — Contamination expérimentale des Acridoidea

Chez les Acridiens, les chances de succès d'une infection *per os* sont liées en premier lieu à l'ingestion des germes, en second lieu à la possibilité de maintenir au laboratoire pendant un temps suffisant les criquets contaminés. C'est pourquoi il est nécessaire d'éliminer un grand nombre d'individus qui refusent l'aliment vecteur, et d'écarter certaines espèces qui n'ont pas supporté un élevage suffisamment prolongé (*Arcyptera fusca*, *Psophus stridulus*, *Calliptamus italicus*). Deux espèces constituent un matériel très favorable, *Locusta migratoria* et *Schistocerca gregaria*. Quelques informations complémentaires ont été obtenues par contamination d'un individu de *Pyrgomorpha conica*.

A. Acrididae. œdipodinae. Locusta migratoria migratorioides.

Pour *Locusta* toutes les tentatives d'infection, quel que soit le stade, ont donné des résultats positifs. Trois moments de la vie de l'hôte ont été choisis pour la contamination : le début du premier stade larvaire (éclosion) le stade pré-imaginal (5^{e} ou 6^{e} stade, suivant les cas), les premiers jours de la vie imaginale. Une cinquantaine d'Insectes ont été utilisés; presque tous ont contracté la maladie. La contamination renouvelée à plusieurs stades de la vie des criquets a également été envisagée.

1. Contamination à l'éclosion.

a) Données biologiques et morphologiques.

Les Insectes provenant d'une même oothèque sont divisés en deux lots de 25 individus, les animaux de chaque lot étant élevés en phase solitaire. Un lot est contaminé, l'autre sert de témoin. Le moment des mues est noté, ainsi que le pourcentage de mortalité, pour chacun des lots.

La mortalité, très faible (10 %), est à peine plus élevée dans le lot contaminé que dans le lot témoin. Elle survient le plus souvent au 5^{e} stade larvaire. Les criquets contaminés ont une coloration qui est celle des témoins. Mais leur croissance est ralentie. Pendant les quatre premiers stades, la croissance est presque aussi rapide que chez les témoins; le

stade pré-imaginal, par contre, est allongé (fig. 14). Dans des conditions identiques d'élevage, la mue imaginale est atteinte en 46,6 jours chez les contaminés, en 37,8 jours chez les témoins. La vie larvaire des Criquets malades est donc plus longue de 23 %. Aucun gonflement de l'abdomen n'est visible. Les animaux s'accouplent, mais aucune ponte n'est déposée.

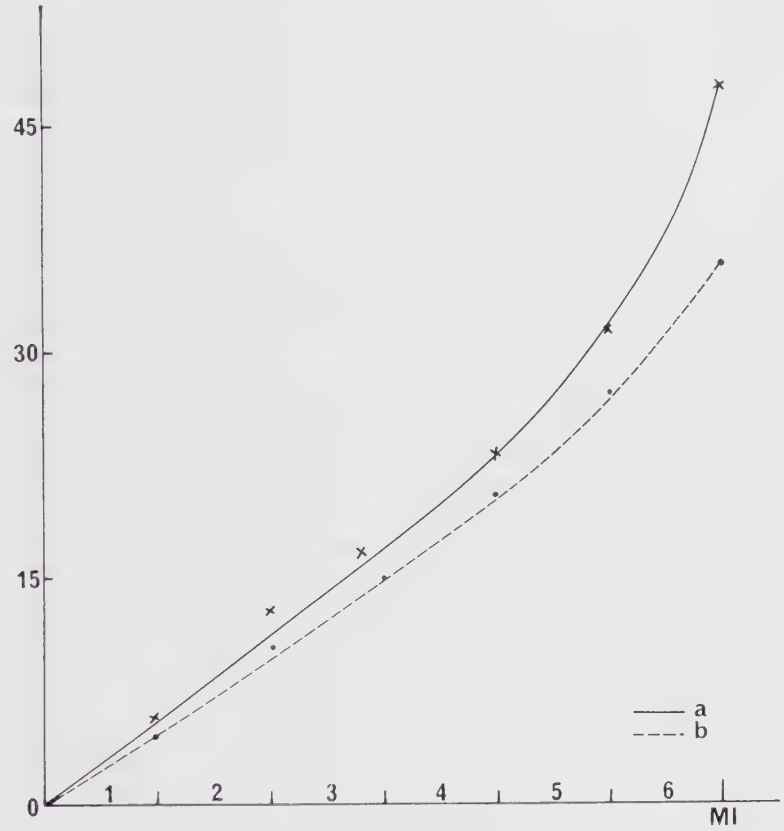


Fig. 14, Courbes des temps de croissance larvaire de *Locusta* isolés sains (courbe b) et de *Locusta* isolés contaminés (courbe a), élevés dans les mêmes conditions.
En abscisses : stades larvaires; MI = mue imaginale;
En ordonnées : temps, en jours.

b) Données anatomiques et histopathologiques.

La recherche des foyers rickettsiens dans les organes confirme que 90 % des criquets ayant ingéré des germes contractent la maladie. L'état des organes sera décrit pour des Insectes fixés entre une et cinq semaines après la mue imaginale, soit de huit à onze semaines après la contamination. A l'examen macroscopique, il n'apparaît pas d'organe blanchâtre comparable au tissu opalescent des grillons. Le corps gras et les testicules

sont bien délimités et de couleur jaune. L'appareil génital mâle comporte des glandes annexes. Chez les femelles, il existe une disproportion entre la gonade dont les ovarioles sont très petits et dépourvus d'œufs mûrs, et les voies génitales qui atteignent un calibre élevé. Dans la région ventrale de l'abdomen, ainsi que sur le pourtour des testicules, le corps gras est parsemé de nombreux nodules bruns, visibles à l'œil nu; on les trouve dans les deux sexes.

C'est au niveau du *corps gras* que l'infection est la plus grave, mais, certains lobes ou fragments de lobes restent toujours indemnes. Chez les femelles, ces lobes sains gardent leur aspect normal (cf. Martoja & Lauverjat, 1965). Le plus souvent, il en est de même chez les mâles; chez quelques individus cependant, les noyaux subissent un accroissement notable, atteignant 45 μ, et sont ovoïdes, alors que normalement ils ne dépassent pas 15 μ et sont anguleux. Il n'est pas rare d'observer, dans un même lobe adipeux, tous les degrés de l'infection depuis les corps globulaires très espacés les uns des autres, jusqu'à la masse homogène de rickettsies qui emplit totalement la cellule. Dans les lobes entièrement envahis, les vacuoles lipidiques et le glycogène disparaissent, d'où une très grande compacité (pl. 20, fig. 4 et 6); les noyaux deviennent pycnotiques. Les nodules mélanisés sont nombreux, groupés en amas au centre de massifs cellulaires très compacts formés de cellules à noyau allongé (pl. 20, fig. 5), et enserrées par des fibres. Par suite de sa quasi disparition dans les cellules infectées, la teneur globale du tissu adipeux mâle en glycogène est très faible. Les urates sont localisés dans des cellules étoilées situées dans les lobes sains ou infectés. La teneur du corps gras en urates est chez la femelle, anormalement élevée. Parallèlement, des sphérocristaux d'acide urique apparaissent dans la lumière des tubes de Malpighi. De tels cristaux n'existent pas, après l'éclosion, chez les Acridiens normaux, l'acide urique étant sans doute excrété par la paroi du tube digestif, comme c'est le cas chez les Dictyoptères et les Dermaptères (Srivastava & Gupta, 1961). Ces faits traduisent donc des troubles de l'excrétion. Les *œnocytes* sont rarement envahis par les rickettsies. Je n'ai observé de corps globulaires dans ces cellules que chez deux femelles mortes une semaine après la mue imaginale, et dont la dégradation du corps gras était exceptionnellement avancée. Les deux catégories de cellules des *glandes salivaires* sont infectées, mais le nombre des cellules saines reste très élevé. L'*appareil génital mâle* est peu dégradé. La paroi des testicules contient de nombreux corps globulaires, mais les amas de rickettsies sont peu nombreux entre les cystes, dans les cellules du tissu interstitiel. Les cystes eux-mêmes ne sont pas envahis, toutefois l'évolution des cellules sexuelles subit un retard : quelques jours après la mue imaginale, les spermatozoïdes sont encore très rares dans les cystes. Les glandes annexes mésodermiques sont bien développées et indemnes; les sécrétions sont comparables à celles des témoins. Il est donc probable que les criquets mâles malades sont fertiles, mais que la maturité sexuelle n'est atteinte qu'assez longtemps après la mue imaginale. L'*appareil génital femelle* n'est pas envahi par les rickettsies. Les oocytes ne parviennent pas à maturité, et

dégénèrent, selon des processus qui seront décrits à propos de l'infection des larves âgées ou des jeunes imagos. L'oviducte latéral et la glande qui le prolonge subissent la même évolution histologique que chez l'imago sain (LAUVERJAT, 1964) : à l'époque de la maturité sexuelle des témoins, les cellules ont les mêmes caractères chez les malades et chez les témoins. Les sécrétions sont aussi abondantes et aussi complexes chez les malades; bien que les œufs ne parviennent pas à maturité, l'Insecte élabore donc toutes les sécrétions nécessaires à la formation de l'oothèque. La présence, dans les voies génitales mésodermiques, de ces abondantes sécrétions explique la disproportion observée à l'examen anatomique, entre la gonade et les voies génitales. Les autres organes sont sains.

2. Contamination proche de la mue imaginale.

a) Données biologiques et morphologiques.

Lorsque la contamination se situe peu avant la mue imaginale (de 5 à 1 jours) ou immédiatement après, aucune mortalité n'apparaît, bien que l'examen histologique révèle la présence de rickettsies chez les Insectes. Les animaux malades sont fixés cinq semaines après la mue imaginale, à un stade où les témoins pondent normalement depuis deux semaines.

Chez les malades, l'accouplement a lieu normalement, mais très rares sont les femelles qui déposent une oothèque; celles-ci sont d'ailleurs dépourvues d'œufs macroscopiquement visibles. La morphologie des malades diffère peu de celle des témoins.

b) Données anatomiques et histopathologiques.

Le corps gras est parsemé de nombreux nodules bruns, surtout autour des gonades et dans les bandelettes ventrales de l'abdomen. Les glandes annexes des mâles sont bien développées. Chez les femelles, les ovaires restent très petits, mais les oviductes latéraux sont d'un calibre élevé.

Le *corps gras* n'est jamais complètement envahi. Le dimorphisme sexuel reste marqué dans les lobes sains, à la fois du point de vue nucléaire, cytoplasmique et histochimique. Dans les lobes infectés, les noyaux gardent leur aspect lié au sexe; par contre, chez la femelle, les ribonucléines des cellules adipeuses disparaissent. Les globules lipidiques deviennent rares dans les deux sexes, ainsi que les urates. Les *œnocytes* restent à l'abri de l'infection. Les *voies génitales femelles* ne sont pas contaminées et sécrètent tous les constituants nécessaires à l'édification de l'oothèque; la *spermathèque* contient de nombreux spermatozoïdes. Mais la fonction ovarienne est profondément perturbée. Les oocytes en interphase de grand accroissement ont un aspect normal. La vitellogenèse s'ébauche normalement, de très nombreux granules de glycogène apparaissent avant le dépôt des plaquettes vitellines. Les cellules folliculeuses ont une disposition et des caractères cytologiques comparables à ceux des femelles saines. A la fin de la vitellogenèse, débutent de fréquents phénomènes de résorption, qui atteignent de préférence les cellules sexuelles situées

à la base des ovarioles, au contact du pédicelle. Ces oocytes restent toujours de petite taille : leur diamètre dépasse rarement 350 μ au lieu de 1 500 μ. Les processus de dégénérescence des oocytes se déroulent suivant plusieurs modalités. Comme chez les grillons malades, il apparaît souvent à la périphérie des cellules en vitellogenèse, une zone intensément colorable par l'acide periodique-Schiff, ne donnant pas les réactions des mucopolysaccharides acides, et représentant probablement des glycoprotides, qui pourraient provenir d'une lyse des plaquettes périphériques. Les cellules folliculeuses restent normales. Certains oocytes sont envahis par de nombreuses cellules probablement issues de la couche folliculeuse, lors de sa disparition (pl. 20, fig. 7); le cytoplasme de l'oocyte et le vitellus subissent une lyse, dont le terme est représenté par une sorte de « *corpus luteum* ». Enfin, dans certains oocytes ayant totalement achevé leur vitellogenèse et pourvus d'un chorion, il se produit une résorption du vitellus, sans pénétration de cellules folliculeuses. La masse vitelline est alors creusée de volumineuses vacuoles de résorption : l'œuf se vide et seul le chorion persiste : (pl. 20, fig. 8 et 9); celui-ci, entourant alors une masse de vitellus très réduite, forme de nombreux replis. Le chorion est ensuite évacué dans les sécrétions des voies génitales (pl. 21, fig. 1). Le Criquet pond alors une oothèque qui, en fait de cellules sexuelles, ne contient que des chorions. Quel que soit le mode de dégénérescence que subissent les oocytes, la conséquence demeure la même : les femelles sont stériles.

Les *testicules* sont peu atteints et la spermatogenèse est normale.

3. Cas des Criquets élevés en phase groupée et contaminés à plusieurs reprises.

Quand les Insectes sont mis en contact des germes une douzaine de fois entre l'éclosion et la mue imaginale, et qu'ils sont élevés à une température plus basse que précédemment, de façon à allonger la vie larvaire (12 semaines), la mortalité est plus élevée (60 %), soit au cours de la vie larvaire, soit au début de la vie imaginale. Pourtant, chez les criquets morts au début de leur vie imaginale, ou chez ceux qui sont fixés trois semaines après cette mue, les désordres histologiques ne sont pas plus grands que chez ceux qui n'ont ingéré qu'une seule fois des rickettsies. Les glandes annexes de l'appareil génital mâle, notamment, existent toujours et sont fonctionnelles.

B. Catantopidae. Schistocerca gregaria.

Dans cette espèce, les résultats de l'infection expérimentale, pratiquée chez des sujets issus de parents élevés en phase isolée, dépendent du stade où les Insectes ingèrent les rickettsies. Le protocole expérimental est le même que pour *Locusta*, les animaux contaminés et les témoins étant élevés en phase solitaire.

1. Contamination à l'éclosion.

a) Données biologiques et morphologiques.

Tous les Insectes contaminés à l'éclosion contractent la maladie et meurent entre quatre et cinq semaines après l'ingestion des germes. Le développement de la pathogenèse n'entraîne pas de gonflement de l'abdomen, mais il modifie la pigmentation : alors que les larves témoins sont d'une couleur où domine le vert, les malades ont un tégument très foncé, où domine le noir; à cet égard, leur coloration est assez proche de celle des larves saines élevées en phase grégaire. Comme chez *Locusta*, la croissance est retardée, puisque cinq semaines après l'infection, les malades meurent au quatrième stade larvaire, alors que les témoins ont atteint le cinquième ou le sixième stade larvaire.

b) Données histopathologiques.

L'étude histologique des animaux fixés quatre semaines après la contamination, à un moment proche de la mort, révèle un développement considérable des plages rickettsiennes. Aucun îlot de corps gras n'est sain ou seulement en voie de contamination. La presque totalité du volume du corps, à l'exception du tube digestif, est rempli par un énorme tissu opalescent constitué aux dépens du corps gras, dont on retrouve les noyaux et les urates, aux dépens également des cellules péricardiales, des glandes salivaires et des œnocytes, presque complètement disparus. Le nombre des nodules est assez élevé sur la face ventrale de l'abdomen. Les urates sont abondants (pl. 20, fig. 2), le glycogène a disparu, ainsi que les vacuoles lipidiques. Il s'ensuit que la compacité du tissu opalescent est très élevée dans cette espèce (pl. 20, fig. 1). Dans les *glandes salivaires*, le nombre des cellules atteintes est élevé, surtout à la périphérie des lobes, qui passent graduellement au tissu opalescent. La *gonade mâle* est profondément dégradée; les cystes qui persistent sont inclus dans le tissu opalescent. Les *ovarioles* de la femelle sont sains, bien que de nombreux foyers rickettsiens soient inclus entre eux (pl. 20, fig. 1). Dans le *tégument*, presque toutes les cellules sont envahies. Parmi les *glandes endocrines*, les glandes ventrales sont les plus atteintes, puisque la presque totalité des cellules contient des corps globulaires (pl. 20, fig. 3) ; les *copora allata* ne sont qu'à demi infectés, le *corpus cardiacum* est sain. Tous les autres organes sont sains; pour certains (tubes de Malpighi), il existe des éléments en voie de différenciation.

2. Contamination au quatrième stade larvaire.

La contamination expérimentale des larves de quatrième âge réussit dans 100 % des cas. Tous les animaux meurent 1 mois après l'ingestion des rickettsies, au cours des premiers jours de la vie imaginale.

3. Contamination proche de la mue imaginale.

Quand l'infection réalisée est de 5 à 10 jours avant la mue imaginale, 30 % seulement des Insectes contractent la maladie ; chez les autres,

l'étude histologique ne révèle aucun foyer de développement des rickettsies. Lorsque la contamination est suivie d'un développement de la maladie, les dégradations histologiques sont aussi considérables que dans le cas d'une infection précoce. Au cours des cinq semaines qui suivent la mue imaginale, les malades ont un comportement sexuel normal, et ils s'accouplent; pourtant, les femelles ne déposent pas d'oothèque. Aucune modification morphologique, aucun gonflement de l'abdomen n'apparaissent. Six semaines après l'infection, les Insectes sont toujours en vie, et c'est ce stade qui a été choisi pour la fixation; il est probable qu'aucune

Légendes de la planche

PLANCHE 20

Rickettsiose chez les Cælifères.

Fig. 1, *Schistocerca gregaria*, larve contaminée à l'éclosion, morte au quatrième stade (Feulgen-picroindigocarmin, 200 diamètres). Le tissu opalescent, en gris, est abondant (en haut et dans la moitié inférieure du cliché). La gonade contient des foyers rickettsiens entre les ovarioles (flèches) qui ne sont pas infectés.

Fig. 2, *Schistocerca gregaria*, même état de contamination que précédemment (Hexaméthylène-tétramine d'argent-vert de méthyle-pyronine, 100 diamètres). Remarquer la richesse du tissu opalescent en urates, en noir.

Fig. 3, *Schistocerca gregaria*, même état de contamination que précédemment (Feulgen-picro-indigocarmin, 100 diamètres). En haut et à gauche du cliché, masse musculaire, saine; en bas et à droite, canal salivaire, sain également; entre ces deux organes, glande ventrale (flèche), contenant de nombreux foyers rickettsiens.

Fig. 4, *Locusta migratoria*, imago femelle, fixé 11 semaines après la contamination à l'éclosion (Feulgen-picro-indigocarmin, 160 diamètres). Remarquer l'absence de tissu opalescent entre les organes qui restent bien individualisés. Le corps gras (cg) est infecté. La spermathèque (sp) et son canal (c) ne le sont pas, et contiennent des spermatozoïdes.

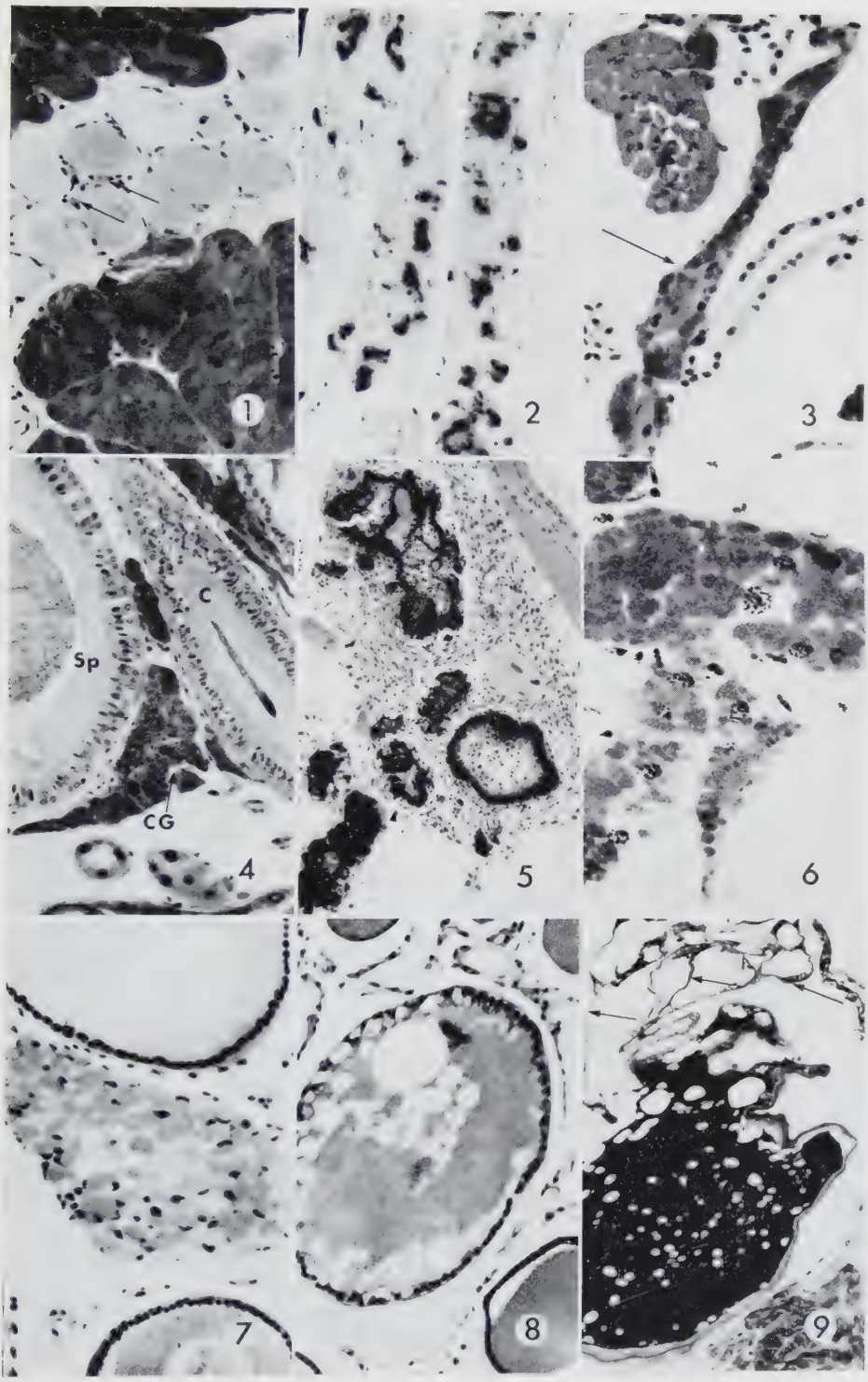
Fig. 5, *Locusta migratoria*, imago mâle, fixé 8 semaines après la contamination au 5e stade (bleu de toluidine 90 diamètres). Agrégat de nodules mélanisés, dans le corps gras. Remarquer l'abondance des mélanines et la disposition en couronne des cellules périphériques.

Fig. 6, *Locusta migratoria*, imago femelle, fixé 20 jours après la mue imaginale et 7 semaines après la contamination à l'éclosion. (Vert de méthyle-pyronine, 270 diamètres). Ilots de corps gras envahis par les rickettsies. Le cytoplasme n'est pas coloré, seuls les noyaux des cellules adipeuses, et les foyers rickettsiens (en gris) sont visibles. Remarquer l'« aspect femelle » des noyaux.

Fig. 7, *Locusta migratoria*, imago femelle, fixé 50 jours après la mue imaginale, 7 semaines après la contamination (méthode de Himes, 100 diamètres). Au centre du cliché, un follicule en dégénérescence. Remarquer l'absence de cellules folliculeuses et la présence, dans l'oocyte, de cellules lécithogènes.

Fig. 8, *Locusta migratoria*, même stade que précédemment (Feulgen-picroindigocarmin, 170 diamètres). Dégénérescence d'un follicule. Remarquer la couronne des cellules folliculeuses, toujours en place, et les vacuoles de résorption du vitellus.

Fig. 9, *Locusta migratoria*, même stade que précédemment (acide periodique-Schiff-hémalun-picro-indigocarmin, 75 diamètres). Stade plus avancé de la résorption du vitellus. Dans la partie de l'oocyte où le vitellus a disparu, le chorion est replié sur lui-même (flèches).


1
2
3
C
Sp
CG
4
5
6
7
8
9

mortalité ne se serait produite si l'expérience avait été poursuivie au-delà. A ce stade, le *corps gras* est soit partiellement, soit totalement envahi; les lobes sains ont les caractères du sexe correspondant; dans les lobes envahis, considérablement hypertrophiés, les noyaux ont un dimorphisme sexuel bien marqué. L'aspect du tissu est souvent celui du *tissu opalescent* des grillons; des fragments de glandes salivaires, les œnocytes, la paroi des testicules fusionnent avec les lobes adipeux pour le constituer. Les nodules sont très nombreux et forment des agrégats visibles à l'œil nu. Dans le tissu adipeux des mâles, le glycogène disparaît; chez les femelles, ce sont les ribonucléines et les protides cytoplasmiques qui n'existent plus. Les *œnocytes*, les *glandes salivaires*, les *cellules péricardiales* sont infectés et ont l'aspect décrit auparavant. La *gonade mâle* est souvent dépourvue de paroi; par suite du développement des plages rickettsiennes entre les tubes séminifères, ceux-ci paraissent inclus dans le tissu opalescent. La spermatogenèse s'y déroule pourtant normalement. Les canaux déférents, qui contiennent des spermatozoïdes, sont sains, les glandes annexes fonctionnelles. Les mâles peuvent donc élaborer leurs spermatophores et féconder les femelles. Ces dernières, par contre, sont stériles, bien que

Légendes de la planche

PLANCHE 21

Fig. 1, Section d'oviducte latéral d'un imago de *Locusta* atteint de rickettsiose (Acide periodique-Schiff-hémalun-picroindigocarmin, 100 diamètres). Remarquer l'abondance des sécrétions, et, surtout, le chorion d'un œuf, replié sur lui-même (flèches) et entourant des sécrétions.

Fig. 2, Corps gras d'un Grillon guéri par les antibiotiques (femelle) (Acide periodique Schiff, jaune de Mars, 100 diamètres). Remarquer l'aspect clair du tissu, débarrassé de ses germes, et la présence de volumineux granules APS-positifs.

Fig. 3, Détail d'une coupe voisine de la précédente (Trichrome de Millot, 500 diamètres). Remarquer les volumineux granules fuchsinophiles.

Fig. 4, Ovaire du même Grillon que pour clichés 2 et 3 (Acide periodique-Schiff-hémalun-jaune de Mars, 100 diamètres). Remarquer le même type de granules (flèches) que précédemment, entre les ovarioles.

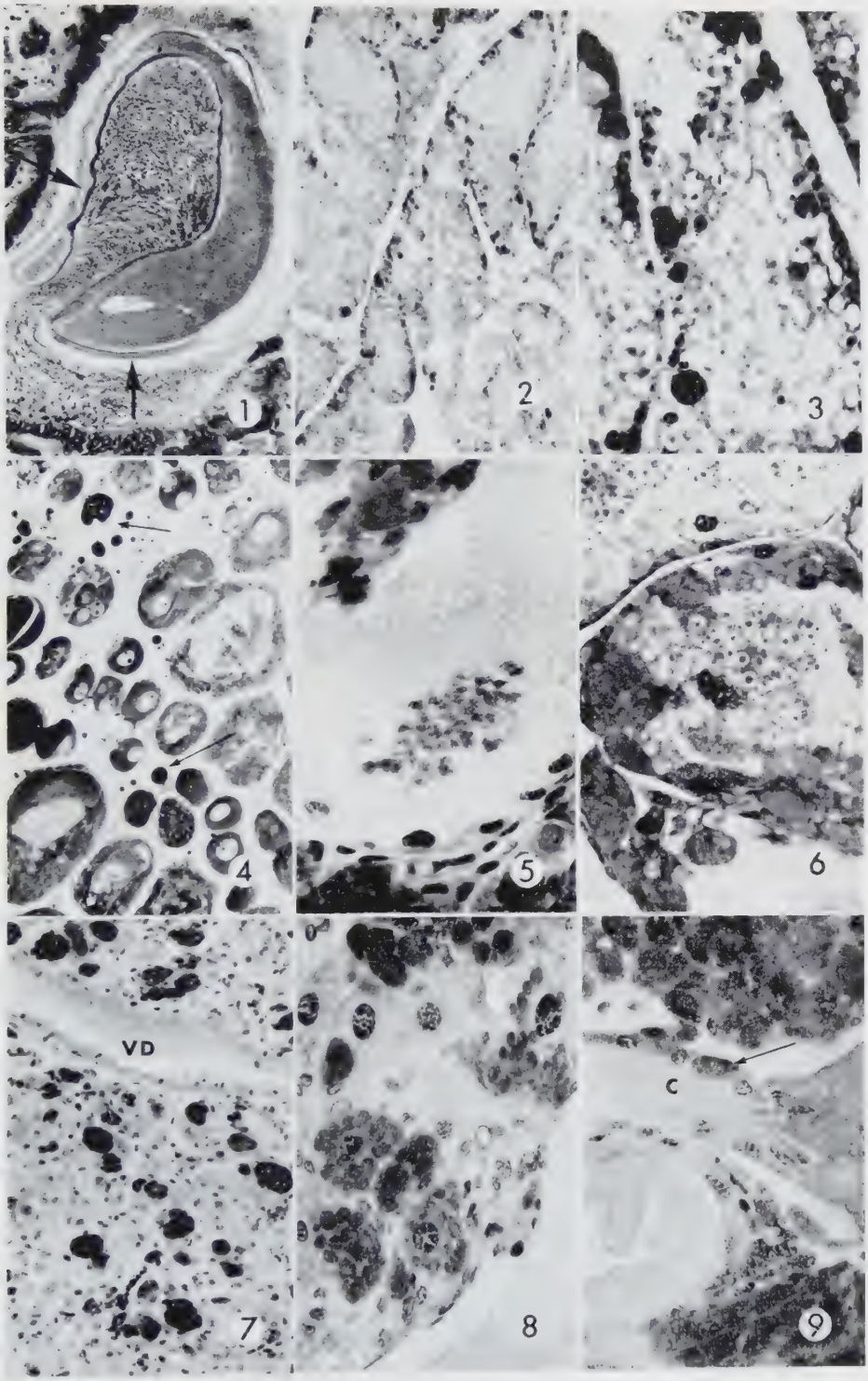
Fig. 5, Tissu adipeux d'un imago contaminé de *Tettigonia*, observé à la mue imaginale (Feulgen-picro-indigocarmin, 450 diamètres). Au centre, une volumineuse cellule à urates (dissouts par le traitement), dont le cytoplasme est envahi (flèches); à la périphérie, cellules adipeuses complètement envahies (en noir).

Fig. 6, Même espèce et même stade que précédemment (Trichrome en un temps, 400 diamètres). Cellules adipeuses infectées (en gris), autour d'une cellule à urates, relativement saine.

Fig. 7, Même espèce, même stade que précédemment (Trichrome de R. y Cajal, 160 diamètres). Autour du vaisseau dorsal (VD), les cellules péricardiales dont certaines (en noir) sont envahies.

Fig. 8, Détail de la préparation précédente (400 diamètres). Remarquer les corps globulaires distincts dans certaines cellules péricardiales.

Fig. 9, Même espèce, même stade que précédemment (Feulgen-picro-indigocarmin, 200 diamètres). Cellule hypodermique infectée (flèche), sous la cuticule (C).


1
2
3
4
5
6
VD
7
8
C
9

les sécrétions constituant l'oothèque soient produites en grande abondance dans les voies génitales. Aucun oocyte ne parvient à maturité. La vitellogénèse a lieu, mais les œufs restent très petits et dépourvus de chorion; à la base de chaque ovariole, les cellules sexuelles se résorbent, sans métaplasie muqueuse, selon des modalités qui rappellent les phénomènes de dégénérescence décrits dans cette espèce (Lusis, 1963).

En conclusion, *Schistocerca gregaria* est une espèce très sensible à la rickettsiose au cours des quatre premiers stades larvaires, beaucoup moins sensible à l'approche de la mue imaginale. Quel que soit le stade de la contamination, l'évolution de la maladie provoque des troubles histologiques importants qui, chez les larves, entraînent une issue fatale dans un délai d'un mois. Un tissu opalescent est réalisé, mais son développement n'est pas suffisant pour provoquer un gonflement de l'abdomen Pour tous les imagos contaminés avec succès, les mâles sont féconds et les femelles stériles.

Légende de la planche

PLANCHE 22

Rickettsiose chez *Tettigonia viridissima*.

Fig. 1, Testicule d'un mâle sain, à la mue imaginale (Trichrome en un temps, 130 diamètres). Remarquer l'importance du tissu interstitiel, et, dans les cystes (en bas), les spermatozoïdes.

Fig. 2, Testicule, à la mue imaginale, d'une Sauterelle malade (Feulgen-picro-indigocarmin, 150 diamètres). Le tissu interstitiel manque, il est remplacé par des foyers rickettsiens (flèches). Remarquer l'absence de spermatozoïdes dans les cystes.

Fig. 3, L'un des deux réservoirs glandulaires des annexes mâles, à la mue imaginale, chez une Sauterelle saine (Feulgen-picro-indigocarmin, 50 diamètres). Remarquer le départ de nombreux tubes glandulaires, encore indifférenciés.

Fig. 4, Les deux réservoirs glandulaires (flèches) des annexes mâles, à la mue imaginale, chez une Sauterelle malade (Bleu de toluidine, 50 diamètres). Remarquer l'absence des tubes glandulaires.

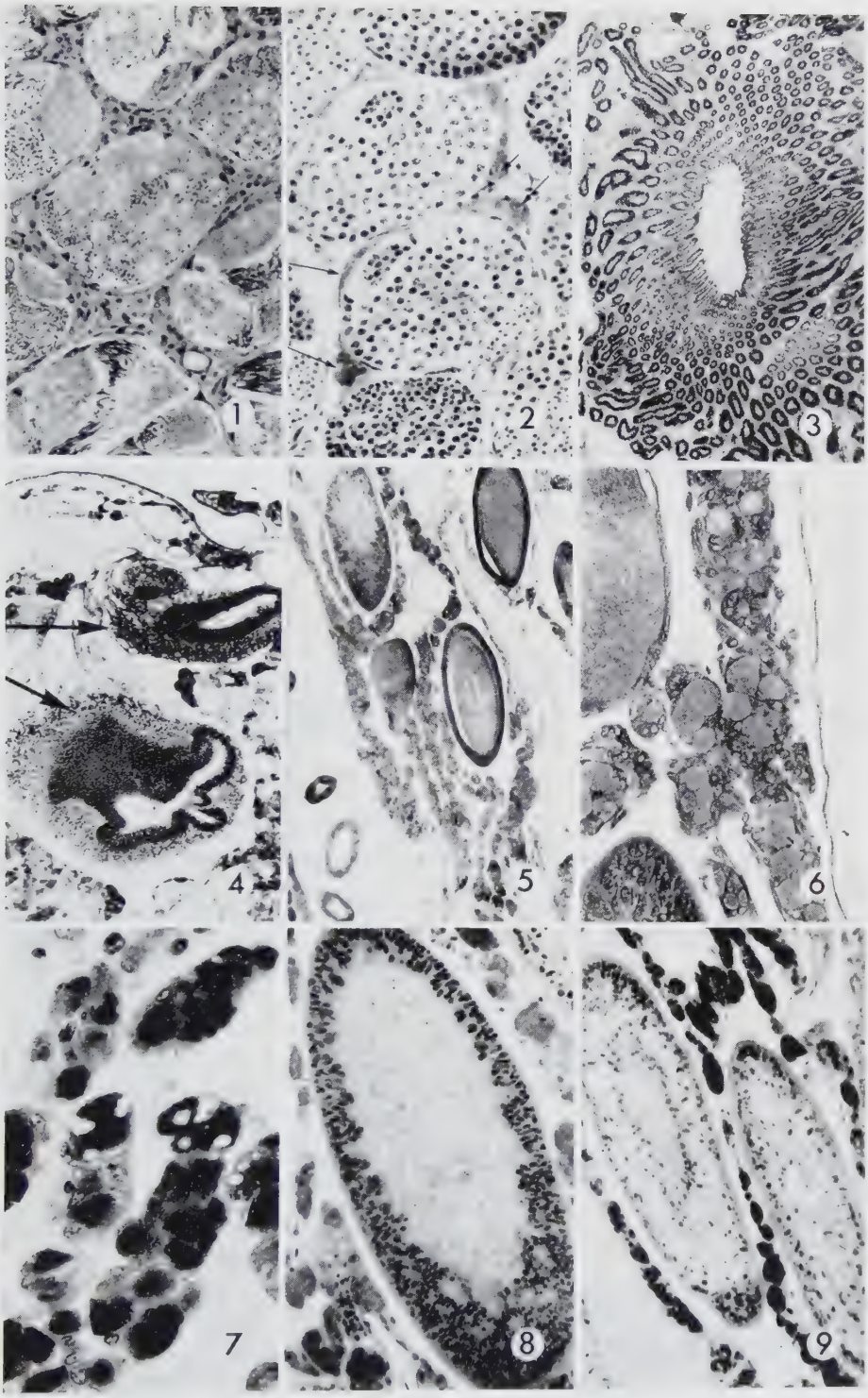
Fig. 5, Fragment d'un ovaire d'un imago de *Tettigonia* malade (Trichrome en un temps, 50 diamètres). Remarquer le petit nombre d'oocytes, et les longs cordons parallèles dont la disposition est celle des ovarioles.

Fig. 6, Détail de la préparation précédente (160 diamètres). Remarquer les petits follicules qui constituent les cordons.

Fig. 7, Même animal que précédemment, mais coloration au Feulgen-picro-indigocarmin (200 diamètres). Remarquer que le centre de chacun des petits follicules n'est pas représenté par un oocyte, mais par un foyer rickettsien (en noir).

Fig. 8, Même espèce, même stade que précédemment (Trichrome en un temps, 200 diamètres). Remarquer la couche anormalement stratifiée des cellules folliculeuses autour de l'oocyte en vitellogenèse.

Fig. 9, Même espèce, même stade que précédemment (Feulgen-picro-indigocarmin, 100 diamètres). Cellules folliculeuses envahissant les oocytes.


1
2
3
4
5
6
7
8
9

C. Pyrgomorphidae. Pyrgomorpha conica.

Un seul essai de contamination a pu être effectué, sur un jeune imago du sexe femelle. L'insecte a ingéré des rickettsies une semaine après la mue imaginale. Il a ensuite été élevé à 25° C, à l'aide de jeunes pousses de blé. Il est mort six semaines après la contamination.

L'animal a gardé son aspect morphologique normal, sans aucun gonflement de l'abdomen. Pourtant, l'examen histologique révèle des troubles graves. Certains organes ont un aspect habituel et ne contiennent pas de germes (système neuro-endocrine, tube digestif, tubes de Malpighi). L'organe le plus dégradé est le corps gras, qui contient une très grande quantité de nodules mélanisés. Après l'infection totale des lobes adipeux, les noyaux conservent les caractères de type femelle déjà décrits chez d'autres Acridiens : forme ovoïde, grande taille (25 à 30 μ de long), richesse élevée en chromatine. Les autres organes infectés ont l'aspect qui a été décrit chez les Acridiens précédemment étudiés. Les conduits génitaux, dont la paroi est riche en A.R.N. et en amino-acides, élaborent d'abondantes sécrétions. Mais, à la base des ovarioles, les oocytes, dépourvus

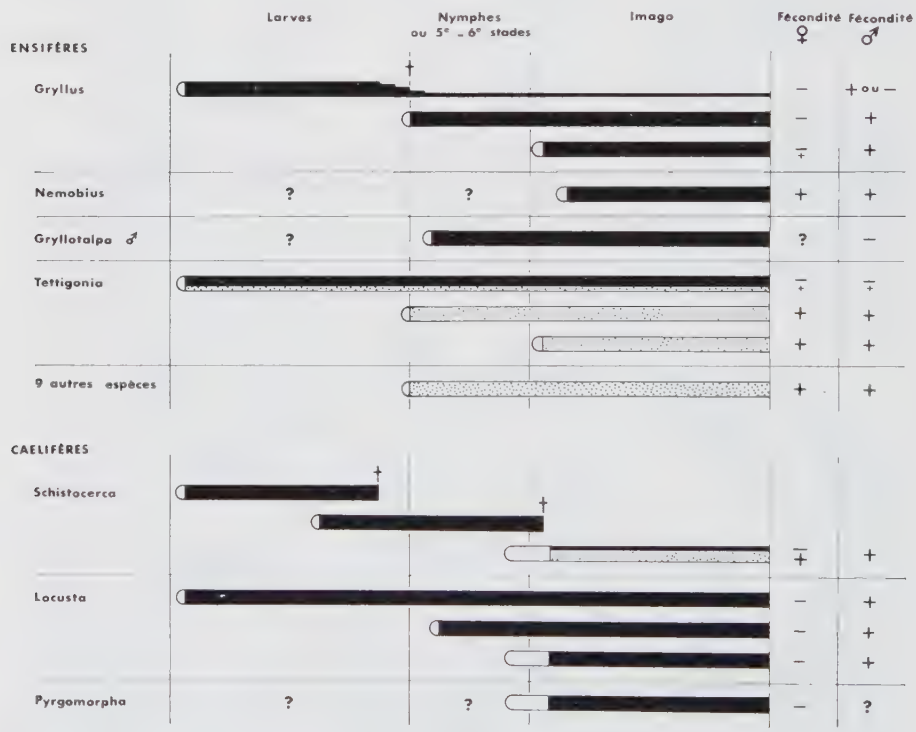


Fig. 15, Schéma résumant les résultats des essais de contamination pratiqués sur diverses espèces d'Orthoptères.
La région blanche des lignes horizontales indique le moment de la contamination, les parties en pointillé traduisent les résultats négatifs, les parties noires les résultats positifs. Les † indiquent les périodes de forte mortalité.

de chorion, se résorbent; comme chez *Schistocerca*, des cellules folliculeuses prolifèrent, envahissent la cellule germinale dont le vitellus dégénère. La lyse des plaquettes vitellines n'est pas accompagnée d'une métaplasie muqueuse.

En résumé, la contamination est possible chez les Pyrgomorphes, à l'état imaginal. Six semaines suffisent pour que le corps gras soit presque totalement envahi, et que d'autres organes présentent d'importants foyers rickettsiens. Comme pour les autres Acridiens, la rickettsiose s'accompagne d'une résorption des cellules sexuelles femelles, à la fin de la vitellogenèse.

Conclusion relative aux Caelifères.

Tous les Caelifères étudiés se révèlent, à des degrés divers, sensibles à *Rickettsiella grylli*. La survie des Insectes contaminés dépend de l'espèce envisagée. Les caractères histopathologiques sont identiques chez tous. L'existence de très nombreux nodules pigmentés, la sécrétion d'une oothèque dépourvue d'éléments germinaux, la différenciation normale de tous les caractères sexuels secondaires, quelles que soient les conditions de la contamination et de l'élevage, se retrouvent dans tous les cas. Des différences existent entre les divers groupes, ou, pour certaines espèces, entre les divers stades où s'effectue la contamination. Ces différences concernent la formation d'un tissu opalescent et la sécrétion d'un chorion par les cellules folliculeuses. Du point de vue de la sensibilité aux germes et des réactions des tissus ou des organes, les Caelifères ne constituent pas un groupe homogène.

LA CONTAMINATION NATURELLE DES INSECTES

Les données précédemment rapportées prouvent que la contagion par voie buccale est fréquente dans le cas de la rickettsiose à *R. grylli*. Toutefois, ce mode de propagation n'exclut pas la possibilité d'une transmission des germes, d'une génération à l'autre, par les cellules sexuelles. En effet, à propos d'autres rickettsies, Ray & Dasgupta (1955 et 1956) ont noté la présence de corps globulaires (NR bodies) dans les cellules folliculeuses. Maillet & Folliot (1964) ont décrit des rickettsies associées aux spermatozoïdes, chez les Homoptères. L'hypothèse d'une transmission congénitale de *Rickettsiella grylli* était donc à envisager.

Deux sortes de méthodes m'ont paru pouvoir apporter quelques éclaircissements dans la difficile recherche de rickettsies à l'intérieur des cellules germinales : l'examen histologique des glandes génitales; la mise en culture aseptique d'œufs pondus par des Insectes malades.

I. — Données tirées de l'examen histologique des gonades

Chez les *Grylloidea*, la présence de corps globulaires dans le cytoplasme des oocytes est rare. Elle n'a été observée que dans un cas, lors de la contamination expérimentale d'une nymphe (Seureau, 1965); il est peu

probable que l'Insecte ait pu pondre ultérieurement, car la vitellogenèse présentait les troubles habituels. D'une façon très générale, les cellules germinales femelles ne présentent, chez les *Grylloidea* et les *Acridoidea*, aucun foyer rickettsien visible en microscopie photonique. Il en est de même pour les cellules folliculeuses, ainsi que pour la masse des spermatozoïdes contenus dans la spermathèque. De plus, la stérilité presque constante des femelles malades est un facteur qui n'est pas en accord avec l'hypothèse d'une transmission congénitale. Ces faits n'excluent pourtant pas la possibilité d'une infection des cellules sexuelles de grillons contaminés tardivement (stade imaginal), par des germes isolés, invisibles après coloration par les réactions nucléales, mais néanmoins capables de transmettre la maladie aux descendants. En ce qui concerne les *Tettigonioidea*, les cellules germinales mâles ne présentent pas de signes d'infection. L'ovaire est envahi, mais les dégradations sont telles qu'aucun œuf n'est pondu. Pourtant, ici encore, une infection légère ou tardive pourrait être suivie d'une infestation difficilement décelable des éléments sexuels.

II. — Données expérimentales

Si la stérilité est la règle générale pour les femelles de grillons atteintes de rickettsiose, exceptionnellement, certaines déposent des œufs, alors que l'examen de leur hémolymphe révèle déjà de nombreuses rickettsies dans le plasma et que le tissu opalescent est très abondant. Ces femelles permettent d'obtenir des œufs provenant d'un organisme complètement envahi.

Ces œufs sont récoltés, et mis en incubation à 30° C. 24 h avant la date prévue pour l'éclosion, ils sont placés en élevage aseptique, selon la méthode utilisée dans la réalisation des grillons axéniques. Mais ici, le milieu d'élevage est évidemment dépourvu de nipagine, dont on connaît l'action antibiotique à l'égard de certaines rickettsies (*Rickettsia prowazkii*, Krieg, 1963). Un mois plus tard, les grillons aseptiques sont fixés au Carnoy, et les organes examinés après coloration au Feulgen.

Douze larves ont ainsi été étudiées; elles provenaient de pontes, d'ailleurs peu abondantes, de deux femelles de *G. bimaculatus* présentant les symptômes extrêmes de la maladie. A l'examen histologique, aucune des 12 larves ne présentait de foyers rickettsiens dans les organes.

En conclusion, il semble qu'au moins chez les grillons, la rickettsiose ne puisse se transmettre par les cellules germinales. La stérilité qui atteint presque tous les imagos femelles, l'absence de germes dans les embryons de ceux qui parviennent à se reproduire, excluent toute participation des gonades à la transmission de la maladie. Les corps globulaires observés dans un oocyte ne constituent qu'une infection accidentelle.

On ne peut évidemment envisager la transmission de la maladie que dans le cadre restreint du laboratoire, puisque cette épizootie n'a pas encore été signalée dans la nature. La contamination successive des diverses souches de grillons, comme celle des jeunes larves d'une même

souche, doit être réalisée par tous les agents susceptibles de transporter des germes d'une population à une autre : Insectes sauvages (blattes), techniciens surveillant les élevages. Dans une même population, le cannibalisme, la présence d'ectoparasites (Acariens), favorisent la transmission des germes. Mais d'autres facteurs, tels la monophagie et une certaine répugnance à ingérer des végétaux contaminés, tendent à réduire les possibilités d'extension de l'épizootie. C'est peut-être ainsi qu'on pourrait expliquer l'absence de contamination naturelle dans les souches d'un Acridien aussi réceptif que *Locusta migratoria*, qui, au laboratoire, est élevé en permanence à proximité des grillons contaminés.

SENSIBILITÉ DES GERMES AUX ANTIBIOTIQUES CONSÉQUENCES PRATIQUES

La sensibilité des rickettsies à divers antibiotiques a été étudiée dans le cas des rickettsioses des Vertébrés. Mais nous ignorons encore quelles sont les substances antibiotiques capables d'inhiber le développement des *Rickettsiella*. C'est pourquoi l'action de certaines de ces substances, reconnues efficaces contre d'autres germes voisins, a été envisagée pour le traitement de l'épizootie à *R. grylli*. Des antibiogrammes ne pouvant être réalisés à propos de germes qu'on ne sait pas cultiver, l'action des antibiotiques ne peut être envisagée que par administration à un hôte contaminé. Deux modes opératoires ont été utilisés : traitement de nouveau-nés venant d'ingérer des germes; traitement de nymphes malades depuis l'éclosion.

Des grillons nouveau-nés (*G. bimaculatus*) reçoivent successivement trois repas contaminés, ce qui suffit à assurer l'apparition de la maladie chez tous les individus. Les grillons sont élevés en groupes de 20 animaux. Les Insectes de chaque lot sont traités, dès la deuxième semaine de la vie larvaire, par un antibiotique mélangé à de la farine, et renouvelé tous les deux jours. Les antibiotiques suivant ont été utilisés, sous forme de poudre orale :

Auréomycine, terramycine, tétracycline, tifomycine, érythromycine.

L'étude du taux de mortalité ne donnerait qu'une idée très approximative des résultats, en raison de nombreux facteurs pouvant intervenir sur la mortalité. C'est donc par l'examen histopathologique que la maladie est recherchée. Tous les grillons sont fixés 30 à 40 jours après la contamination, c'est-à-dire au stade nymphal; ce délai est suffisant pour que la contamination soit très avancée, même chez les individus qui résistent exceptionnellement bien à la maladie.

80 % des animaux traités à la tifomycine présentent les signes morphologiques, anatomiques et histologiques de la rickettsiose. Mais les autres antibiotiques sont très efficaces contre les rickettsies, aucun des grillons contaminés ne contractant la maladie.

Les antibiotiques, ou des mélanges des antibiotiques reconnus efficaces d'après l'étude précédente, sont administrés à des nymphes de *G. capitatus* dont le gonflement de l'abdomen et la présence de rickettsies dans l'hémolymphe indiquent l'état très avancé de la maladie. Une

expérience préliminaire ayant montré qu'un traitement de 8 jours de ces nymphes ne produisait pas d'améliorations histologiquement décelables, les Insectes n'ont été fixés que 30 à 40 jours après le début du traitement, à un stade où la maturité sexuelle des témoins était acquise depuis plusieurs semaines. Les résultats des observations histologiques sont quelque peu différents selon les sexes.

Chez les mâles, le tissu adipeux est complètement débarrassé des germes. Seuls subsistent, en quelques points du tissu, de rares nodules mélanisés, et des sortes de tumeurs comprenant un grand nombre de cellules fusiformes et des fibres de collagène (pl. 19, fig. 11). Les œnocytes sont sains et existent en très grand nombre. Deux groupes de foyers rickettsiens persistent encore dans l'organisme. Ce sont d'abord de nombreuses plages rickettsiennes dans les ganglions nerveux. Ce sont surtout d'importantes nappes de germes intratesticulaires. Celles-ci ont un développement considérable et sont localisées entre les tubes séminifères; l'aspect de la gonade est identique à celui qui a été décrit chez les grillons malades, à un stade où les germes n'ont pas encore envahi les cystes. Il est rare que les glandes annexes soient différenciées; ceci est sans doute lié au moment où le traitement commence à agir; on sait, en effet, que ces glandes apparaissent au stade deutonymphal (Bouthier, 1964). Chez certains individus, dans la paroi du réservoir glandulaire qui reçoit normalement les tubes glandulaires mésodermiques, se différencient des tubes très courts qui élaborent des sécrétions (pl. 1[illegible], fig. 5). Il s'agit là d'un début de différenciation des tubes glandulaires, début qui reste très limité, tant par le nombre des tubes formés (une dizaine au maximum, alors qu'il en existe plus de 800 chez le Grillon sain), que par leur faible développement : jamais ces tubes ne parviennent à faire extrusion hors de la paroi du réservoir. Leur apparition traduit néanmoins le rétablissement de conditions physiologiques proches de la normale. Dans tous les cas, la spermatogenèse est inachevée. Il en résulte que les Insectes restent stériles.

Chez les femelles, il n'existe plus de foyers rickettsiens importants que dans le système nerveux, et aussi parfois dans le corps gras. Dans les lobes sains du tissu adipeux, certains caractères du tissu femelle réapparaissent : basophilie, richesse assez élevée en ARN et en amino-acides divers. Mais les caractères sexuels de l'organe sont pourtant loin d'être aussi marqués que chez la femelle normale, et l'aspect du tissu adipeux, encore très vacuolisé, est plutôt intermédiaire entre le type mâle et le type femelle. Les œnocytes sont nombreux et sains. La gonade reste de petite taille, mais la vitellogenèse est moins perturbée que chez les malades non traités : de nombreuses cellules folliculeuses contiennent encore du vitellus; certains follicules subissent encore une atrésie. Mais quelques oocytes parviennent à maturité, sont dotés d'un chorion et sont pondus dans les voies génitales. Il apparaît aussi, dans les vastes espaces situés entre les ovarioles, des boules dont les affinités tinctoriales et les caractères histochimiques sont ceux des plaquettes vitellines (pl. 2[illegible], fig. 4). Cet aspect aberrant de la gonade va de pair avec l'apparition, dans les régions

périphériques des lobes du corps gras, de très nombreux granules de glycogène et d'éléments figurés de plus grande taille (pl. 21, fig. 2 et 3) ayant les caractères histochimiques des plaquettes vitellines. Jamais de tels éléments n'existent dans le tissu adipeux des femelles saines; quant au glycogène, il est également très rare chez ces dernières (MARTOJA & LAUVERJAT, 1965). Il ne saurait être question d'émettre l'hypothèse d'une synthèse de vitellus par les cellules adipeuses; les réactions histochimiques qui signalent des analogies entre ces éléments et les plaquettes des oocytes ne détectent, en effet, que des « groupements ou radicaux » chimiques largement répandus dans les élaborations d'origine diverse. Mais, à la lumière des connaissances actuelles sur le rôle du corps gras dans la synthèse des métabolites nécessaires à la fonction ovarienne, on peut penser que ces éléments à caractères de plaquettes vitellines traduisent, tout comme le glycogène qui doit en être le précurseur, une reprise de l'activité métabolique du tissu restauré. L'absence d'images identiques dans le tissu adipeux des mâles traités aux antibiotiques permet d'écarter l'hypothèse d'une perturbation provoquée par les antibiotiques. Chez les grillons femelles guéris, la gonade est très peu développée, ce qui a pour conséquence une production réduite de vitellus. Ainsi s'explique peut-être que les protides et glycoprotides élaborés dans le corps gras, ne soient pas entièrement utilisés pour l'élaboration du vitellus.

En conclusion, le traitement des femelles malades par les antibiotiques permet une reprise de l'activité ovarienne et rétablit la fécondité. Il n'en est pas de même chez les mâles, dont les testicules constituent des foyers rickettsiens très résistants, et dont les spermatophores ne peuvent souvent pas être élaborés.

DISCUSSION

L'étude comparative de l'infection expérimentale et des troubles histopathologiques occasionnés à diverses espèces d'Orthoptères par la rickettsiose, permet de dégager un certain nombre de données dont certaines sont originales.

Rickettsiella grylli, espèce nouvelle découverte dans diverses souches de *Gryllus*, n'est pas spécifique de cet hôte. Les essais de contamination par voie buccale ont révélé la grande sensibilité à son égard de représentants de plusieurs familles de *Grylloidea*, *Tettigonioidea* et *Acridoidea*. Bien qu'aucune tentative n'ait pu être effectuée chez les *Gryllacridoidea* et les *Tridactyloidea*, les espèces qui se sont révélées sensibles au germe couvrent assez bien l'ensemble de l'ordre des Orthoptères; *Rickettsiella grylli* se développe ainsi dans des Insectes dont la Biologie et l'Ethologie présentent de grandes différences. Cette rickettsie doit être considérée comme l'agent pathogène de la « rickettsiose des Orthoptères », plutôt que de la « rickettsiose des grillons ». Il est d'ailleurs possible que l'absence de spécificité vis-à-vis d'un hôte déterminé soit un caractère du genre *Rickettsiella* tout entier, puisque selon KIEG (1958) et HURPIN (1960),

R. melolonthae peut contaminer plusieurs espèces de Coléoptères. Il en est de même pour *R. stethorae* (Hall & Badgley, 1957) et *R. popiliae* (Dutky & Gooden, 1952).

Des essais de contamination réalisés dans des conditions comparables ont montré que certaines espèces d'Orthoptères se révèlent sensibles au germe à n'importe quel moment de leur vie, alors que pour d'autres, la sensibilité diminue en fonction de l'âge, au point que dans certains cas, l'imago est totalement réfractaire. Les variations spécifiques de la sensibilité expliquent que certaines espèces, dont il n'a pas été possible de contaminer de larves très jeunes, n'aient pas constitué un matériel favorable à une étude histopathologique. D'autre part, la sensibilité au germe pathogène est sans rapport avec la position systématique de l'hôte; il en est de même pour les dégradations histologiques et le taux de mortalité. Dans une même espèce, voire dans un lot de congénères, il peut, de plus, exister plusieurs types de réactions des individus contaminés (Seureau, *Gryllus*, 1965). Dans les espèces où des mesures ont été possibles, un ralentissement de la croissance a été constaté. Contrairement à d'autres agents pathogènes (*Nosema*, Fischer, 1963; Fischer & Sandborn, 1964), *R. grylli* ne possède pas d'action « juvénile ».

Sur le plan cytologique, et pour tous les hôtes envisagés, *R. grylli* ne se développe que dans le cytoplasme. Les pycnoses observées dans les noyaux ne sont que la conséquence de la mort des cellules. Dans tous les cas, le germe se développe sans qu'il apparaisse de « formes cristalloïdes », formes qui ont pourtant été considérées comme caractéristiques du genre *Rickettsiella* (Krieg, 1963). On sait que deux hypothèses ont été proposées pour expliquer l'origine de ces pseudo-cristaux : origine proprement rickettsienne (Huger, 1962), ou bien transformation de granules protidiques du corps gras (Huger, 1959). Or, pour certaines espèces d'Orthoptères que j'ai pu contaminer, le tissu adipeux contenait de nombreux granules protidiques analogues à ceux des Coléoptères (larves de *Gryllus*, obs. inédite; imago mâles de *Tettigonia*, Martoja & Lauverjat, 1965); pourtant, quel que soit le stade examiné et la nature du fixateur, jamais il n'existe de cristaux. Les cristaux des rickettsies autres que *R. grylli* ont sans doute pour origine des germes pléomorphes; *R. grylli* n'en élabore aucun, bien que des formes géantes existent dans cette espèce.

Le corps gras constitue, comme dans les autres rickettsioses d'Insectes, l'organe dont la contamination est la plus précoce et la plus complète. Suivant les espèces, l'infection totale n'est pas réalisée dans les mêmes délais : 20 à 30 jours suffisent chez *Gryllus* ou *Schistocerca*, alors que pour *Locusta* toute la vie de l'Insecte y suffit à peine. L'intensité de l'infection dépend également du stade auquel est effectuée la contamination, le tissu larvaire étant plus rapidement envahi que le tissu imaginal. Pour toutes les espèces, la multiplication des germes dans les cellules adipeuses provoque en premier lieu une hypertrophie des lobes de l'organe, hypertrophie qui est d'autant plus nette que les espèces sont plus sensibles (*Gryllus*,

Schistocerca). Puis certains constituants fondamentaux du tissu disparaissent toujours : glycogène chez les imagos mâles, A.R.N. et protides chez les imagos femelles. Pour certaines espèces, la teneur en urates augmente beaucoup, les granules de déchet étant localisés dans les restes des cellules à urates, également envahies. On sait quel rôle important est assumé par le corps gras dans le métabolisme intermédiaire. Que la mort survienne précisément au moment où ce tissu est complètement envahi (Martoja, *Schistocerca*, 1963; Seureau, *Gryllus*, 1965) laisse penser qu'elle résulte, au moins en partie, de la suppresion de ses fonctions métaboliques. Chez les Insectes qui parviennent à l'état imaginal, c'est aussi à la perturbation des fonctions du corps gras qu'on peut rapporter certaines déficiences dans la vitellogenèse. Évidemment, dans l'un et l'autre cas, l'action propre des germes, par des toxines, n'est pas à exclure.

Les œnocytes, que les recherches histologiques associent souvent au corps gras (Coupland, 1957), constituent pourtant un important ensemble dont les réactions peuvent être bien différentes de celles des cellules adipeuses. Alors que pour certaines espèces (*Gryllus*, *Schistocerca*), la sensibilité des œnocytes et la chronologie de l'infection vont de paire avec le développement de la pathogenèse du corps gras, dans d'autres espèces (*Locusta*) les œnocytes restent indemnes au milieu d'éléments adipeux fortement infectés. Nos connaissances sur le rôle des œnocytes dans la physiologie de l'Insecte n'en sont encore qu'au stade des hypothèses. Il serait illusoire de rapporter à leur dégradation, ou à leur disparition, une quelconque anomalie des Insectes malades.

La gonade mâle constitue, dans tous les cas, un organe très sensible aux rickettsies. A l'intérieur de cet organe, la double paroi des tubes séminifères et des cystes semble constituer une barrière que les germes franchissent difficilement. Aussi, quand des plages rickettsiennes sont confinées entre ces tubes, la spermatogenèse peut-elle se dérouler normalement, quoique avec un certain retard. En cas de traitement par les antibiotiques, la gonade représente l'un des derniers foyers rickettsiens importants dans un organisme rétabli, et ce fait s'oppose à un retour de la fécondité.

La gonade femelle fournit l'exemple d'une sensibilité sujette à variation spécifique. Chez les *Grylloidea* et les *Acridoidea*, l'infection est limitée à de rares cellules somatiques, et ce n'est qu'exceptionnellement qu'une cellule germinale présente des corps globulaires. Chez les *Tettigonioidea*, au contraire, l'infection de l'ovaire est massive et atteint aussi bien les cellules germinales que les éléments somatiques; au terme de la pathogenèse, la destruction de la gonade est très prononcée.

Le système neuro-endocrine est fréquemment infecté, mais il existe une grande variabilité individuelle. Comme pour les œnocytes, il est difficile de rapporter à l'infection de ce système une déficience particulière. Il est par ailleurs difficile d'imaginer, pour une série d'organes dont le nombre total de cellules infectées ne dépasse pas la moitié des cellules totales (glandes endocrines) ou reste très faible (tissu nerveux), quel degré

d'infection peut avoir des conséquences physiologiques très prononcées. Ainsi, l'infection de la glande prothoracique des grillons ou de la glande ventrale des criquets n'empêche pas la mue. Peut-être les modifications de pigmentation des larves de *Schistocerca* ont-elles pour origine une déficience des *corpora allata*, qui, chez d'autres criquets, sont responsables de la synthèse des pigments verts (Joly, 1962). Peut-être les tumeurs de la paroi du tube digestif tirent-elles leur origine de troubles nerveux ou endocrines, comme le fait a pu être démontré chez les Phasmes et les Blattes (Pflugfelder, 1948; Harker, 1958), ou chez les Acridiens (Matz, 1964, 1965).

Pour de nombreux organes, l'infection est à la fois limitée et variable selon les espèces ou les individus. C'est le cas des cellules péricardiales ou des glandes salivaires. Pour celles-ci, le nombre des cellules atteintes est toujours plus élevé chez les Ensifères que chez les Caelifères, bien qu'on ne puisse évaluer avec précision le degré de réduction de l'organe, les acini glandulaires diffus ne se prêtant pas à une numération. Jamais il n'y a disparition totale de ces glandes. Les tubes de Malpighi ne présentent de signes d'infection que chez les Gryllides, et, dans ce groupe, chez les individus les plus gravement atteints. Il en est de même pour les cellules hypodermiques, celles de l'iléon ou de l'uretère, celles de la spermathèque et de son canal. Il semble que, pour toutes ces cellules l'infection soit possible, mais seulement dans certaines conditions extrêmes, peut-être en liaison avec les facteurs externes, tels que le contact permanent avec les germes, les variations de l'hygrométrie, la qualité de la nourriture dont on sait l'influence sur la sensibilité aux germes pathogènes (Vago, 1951), la température d'élevage, etc. Sans doute l'infection de tels tissus serait-elle réalisable, dans les espèces où elle n'a été que rarement constatée (*Locusta*) si l'on réalisait des conditions d'élevage particulièrement défavorables pour l'hôte.

La transmission de la maladie d'un organe à un autre est assurée par des hémocytes chargés de germes, qui s'accolent à la périphérie des organes sains. Le phénomène est particulièrement net dans le cas des tubes de Malpighi. Les plages rickettsiennes qui sont assez fréquentes dans le tissu conjonctif péri-intestinal, ont vraisemblablement une origine identique. Ce sont aussi des cellules de l'hémolymphe qui ont été rendues responsables, dans la rickettsiose de *Melolontha*, de la formation de nodules pigmentés, qui traduisent une réaction de défense de l'hôte. Il faut sans doute attribuer à des réactions spécifiques les réactions différentes que présentent les Caelifères et les *Gryllotalpidae*, d'une part, les *Grylloidea* et les *Tettigonioidea* d'autre part. Chez les premiers, l'infection expérimentale est toujours suivie de l'apparition de plusieurs centaines de nodules, souvent groupés en amas, parsemant le tissu adipeux et paraissant effectivement correspondre à une réaction primaire des tissus de l'hôte à des corps étrangers (réaction d'encapsulement). Chez les seconds, les nodules sont toujours rares, même inexistants chez certains individus contaminés à l'éclosion et examinés un mois plus tard; ils n'existent en nombre plus élevé que chez les imagos dont les organes sont les plus dégradés. Leur structure et

leurs caractères histochimiques sont comparables à ceux des nodules des Caelifères, mais ils sont de plus petite taille. Leur apparition tardive est peu compatible avec l'hypothèse selon laquelle ils représenteraient une réaction de défense. Quoi qu'il en soit, ils doivent avoir, dans tous les cas, une origine commune, à savoir la nécrose des hémocytes qui les constituent. Les pigments qui les caractérisent sont riches en dérivés des phénols (mélanines); ils sont absolument comparables à ceux qui apparaissent lors d'autres nécroses cellulaires, chez les Orthoptères, tels les pigments du corps jaune du mésentéron, formés au moment de l'exuviation.

Le nombre des organes que les germes peuvent envahir est donc très élevé dans tous les groupes d'Orthoptères, mais leur dégradation n'entraîne pas toujours la formation d'un tissu opalescent, sorte de culture rickettsienne réalisée dans les régions dégénérées de divers tissus, plus ou moins fusionnées entre elles, et dont le corps gras constitue le noyau primitif. Ce terme de « tissu opalescent » a été introduit ici pour rendre compte de l'évolution ultime de certains organes des grillons contaminés. La notion repose sur des bases histologiques et histochimiques, telles la métaplasie adipeuse. Ce tissu apparaît à l'examen macroscopique comme une formation blanchâtre de consistance semi-fluide, qui occupe un volume considérable dans l'abdomen de l'Insecte dont il peut provoquer le gonflement. Son apparition, lors de la rickettsiose des Orthoptères, n'est pas constante. Ce tissu n'existe que dans certaines espèces, qui ne sont pas obligatoirement les plus sensibles à l'infection. Dans certains cas, en effet, la multiplication des rickettsies dans un organe en altère la morphologie en provoquant soit une hypertrophie (corps gras de *Locusta*) soit une atrophie (ovaire de *Tettigonia*), mais elle n'en supprime pas les limites. Même dans les cas d'hypertrophie, les organes gonflés n'arrivent que rarement au contact les uns des autres ; c'est le cas pour le corps gras de *Locusta*, dont les bandelettes hypertrophiées et très compactes restent bien individualisées. Aucun tissu de synthèse du type du tissu opalescent ne peut alors se constituer. Il s'ensuit que, dans ces espèces, la détection de la rickettsiose est la plus délicate; les observations morphologiques externes et l'autopsie donnent souvent des résultats douteux, et ce sont d'autres critères qui doivent être pris en considération.

Si de nombreux tissus laissent pénétrer les germes dans leurs cellules, il en est d'autres qui opposent une barrière à l'infection. Malgré tout, certains d'entre eux sont le siège de réactions secondaires, ou sont perturbés dans leur fonction; la gonade femelle des Acridiens et des *Grylloidea*, la paroi intestinale, les tubes de Malpighi en sont des exemples. L'ovaire des grillons et celui des Caelifères présentent une série de troubles graves, qui ont pour conséquence une stérilité presque constante des femelles contaminées. Un premier ensemble de perturbations concerne, chez les grillons, la vésicule germinative des oocytes en vitellogenèse, ainsi que les cellules folliculeuses, dont le rôle dans la synthèse des plaquettes vitellines se trouve ainsi occasionnellement confirmé. Dans tous les groupes (*Grylloidea* ou Caelifères), d'autres troubles affectent la vitellogenèse, pourvu que les Insectes aient été infectés suffisamment longtemps avant

la période de maturité sexuelle. Il en résulte la formation d'œufs anormalement petits, qui ne sont pas pondus. La lyse des plaquettes vitellines, et accessoirement du cytoplasme de l'oocyte et des cellules folliculeuses, provoque, chez les seuls Ensifères, une métaplasie muqueuse, alors qu'elle ne s'accompagne pas d'une telle métaplasie chez les Caelifères. Ces deux modes de dégradation sont à rapprocher de certaines différences de composition chimique du vitellus dans ces deux sous-ordres d'Orthoptères : le vitellus des Ensifères est riche en mucopolysaccharides acides « masqués », celui de tous les Caelifères en est dépourvu. Les perturbations de la vitellogenèse provoqueraient ainsi, chez les Ensifères, une sorte de « démasquage naturel » des mucopolysaccharides acides, et pourraient s'opposer à la réalisation des liaisions habituelles entre glucides et protides. D'une façon générale, certains aspects morphologiques de la dégénérescence des cellules sexuelles les plus proches des pédicelles diffèrent assez peu, chez les Caelifères, des aspects classiques de résorption décrits chez *Locusta* (Singh, 1958) ou *Schistocerca* (Lusis, 1963). Mais de plus, dans ces mêmes espèces, certaines modalités de la résorption due à la rickettsiose conduisent à la ponte de chorions vides, dépourvus de cellules germinales, fait inconnu à ce jour. Pour les Ensifères, où il n'existe pas de données antérieures, certains aspects de l'atrésie des follicules rappellent aussi la résorption des follicules des Acridiens; d'autres, comme la formation d'un anneau périphérique de polysaccharides ou la disparition des cellules folliculeuses à certains niveaux de l'ovariole n'ont jamais été décrits et n'ont été observés ici que chez les grillons. Il est difficile d'imaginer le déterminisme précis de la résorption des oocytes. Il semble impropable qu'elle soit due à une déficience neuro-endocrine (Highnam, Lusis & Hill, 1963; Hill, 1963; Girardie, 1963), ce système étant, en général, incomplètement atteint. D'ailleurs, le fait que la vitellogenèse puisse s'ébaucher et se poursuivre parfois jusqu'à un stade avancé, paraît montrer que la déficience des *corpora allata* n'est pas en cause. D'autres mécanismes peuvent être envisagés et d'abord une suppression progressive du métabolisme intermédiaire, résultant de la destruction du corps gras. Pourtant, la restauration complète de cet organe, obtenu par action des antibiotiques, ne rétablit pas toujours une vitellogenèse normale. L'action propre des toxines produites par les germes rendrait compte des troubles de la vitellogenèse dans un organisme dont le tissu adipeux n'est pas entièrement envahi (*Locusta*). Ces deux facteurs conjugués expliquent pourtant mal les phénomènes de résorption : le premier n'influe que sur l'élaboration du vitellus; le second n'intervient sans doute pas dans la dégénérescence des follicules, puisque celle-ci se produit encore chez les Insectes débarrassés de leurs rickettsies par les antibiotiques. Admettre avec Lusis (1963) que les oocytes possèdent des « potentialités de résorption, dont la réalisation peut dépendre de divers facteurs » n'apporte pas une explication satisfaisante. De toute façon, la stérilité n'est pas due à une impossibilité de ponte, puisque les glandes annexes et les voies génitales sécrètent normalement les constituants de l'oothèque. Ici apparaît l'indépendance des annexes glandulaires femelles à l'égard de la fonction ova-

rienne, indépendance signalée dans d'autres groupes d'Insectes (Dupuis, *Phasiinae*, 1963).

En ce qui concerne les parois intestinales, celles-ci présentent fréquemment, chez les grillons, des tumeurs qui apparaissent en l'absence de foyers rickettsiens, dans les segments à revêtement cuticulaire surtout. Ces formations secondaires pourraient être causées, comme les tumeurs des Dictyoptères (Pflugfelder, 1948), par des troubles du système endocrinien.

L'infection des tubes de Malpighi, chez les Gryllides les plus atteints, entraîne sans doute des perturbations de la fonction d'excrétion. Mais celles-ci peuvent apparaître sans que les cellules des tubes de Malpighi soient infectées (Acridiens).

L'inhibition du développement de certains caractères sexuels secondaires « internes », comme les glandes annexes mâles et les caractères du corps gras des femelles, oppose les Caelifères aux Ensifères. Dans les deux sous-ordres, la rickettsiose reste sans effet sur l'apparition des caractères sexuels externes (élytres, *génitalia*, chant). Chez les seuls Ensifères, la maladie inhibe, au moins chez les individus les plus atteints, le développement des glandes annexes de l'appareil génital mâle et la différenciation des caractères nucléaires et cytoplasmiques des cellules adipeuses femelles. Il aurait été du plus haut intérêt que l'étude comparée des organes infectés, dans les deux sous-ordres, conduise à l'identification de l'organe qui régit la mise en place de ces caractères sexuels. Ce fait aurait apporté une solution au difficile problème de la différenciation des caractères sexuels secondaires chez les Orthoptères. Il est possible de formuler l'hypothèse d'un déterminisme endocrine. Malheureusement, dans le cas des Insectes dépourvus de glandes annexes, les foyers rickettsiens des glandes endocrines ou des centres nerveux, en particulier du dernier ganglion abdominal, sont en nombre très variable. Nous avons discuté précédemment de la difficulté d'apprécier le degré d'infection qui puisse entraîner des troubles graves. Il est tout aussi difficile d'imaginer que les œnocytes soient impliqués dans ce déterminisme : s'ils sont indemnes et en nombre normal chez les *Locusta* malades, toujours pourvus de glandes annexes, ils subissent par contre, chez *Schistocerca*, lui aussi pourvu de ses glandes, une dégénérescence comparable à celle des *Grylloidea*. Il ne semble pas non plus qu'on puisse invoquer une déficience du métabolisme intermédiaire et des troubles généraux de la division cellulaire; en effet, même chez les Insectes les plus atteints, d'autres organes se différencient de façon normale à tous les stades larvaires : c'est le cas des tubes de Malpighi dont le nombre augmente régulièrement par poussée et différenciation de nouveaux tubes; c'est le cas aussi des épithélium de recouvrement qui s'accroissent par division cellulaire tout au long de la vie larvaire. A ne considérer que les Ensifères, on pourrait admettre que le tissu interstitiel de la gonade mâle est capable d'induire la poussée des tubes glandulaires; très développé chez les *Tettigonioidea*, plus discret chez les *Grylloidea*,

ce tissu manque complètement chez les malades. Il est pourtant difficile de retenir cette hypothèse, qui conduirait à imaginer un déterminisme différent pour les deux sous-ordres d'Orthoptères, les Caelifères ne possédant pas de tissu interstitiel intratesticulaire. Ce problème de la différenciation des caractères sexuels secondaires des Orthoptères, qui paraissait pouvoir être résolu par l'examen comparatif des Insectes contaminés, reste donc posé. Cette rickettsiose provoque des troubles histologiques et physiologiques trop nombreux et son action est trop peu sélective pour conduire à une interprétation indiscutable. L'étude des animaux contaminés a néanmoins permis de constater l'indépendance réciproque des caractères sexuels secondaires internes et externes des Ensifères, indépendance qui apparaît moins nettement à l'occasion d'autres anomalies (néoténie, Cousin, 1938).

La maladie entraîne la stérilité des mâles d'une façon très générale chez les Ensifères. Le plus souvent, celle-ci résulte de l'absence des tubes glandulaires annexes, ou bien de la destruction précoce de la gonade larvaire, plus rarement d'une dégénérescence des spermatozoïdes. L'étude de l'appareil génital des Orthoptères contaminés permet également de mettre en évidence une certaine indépendance dans l'activité d'organes dont les fonctions sont synchrones chez les Insectes sains. C'est le cas des testicules et des glandes annexes des Caelifères; chez les sujets contaminés, ces dernières élaborent leurs sécrétions, destinées à former un spermatophore, alors que les spermatozoïdes ne se différencient pas. Le même phénomène existe chez la femelle des Caelifères, entre ovaires et voies génitales; quel que soit le stade de dégénérescence de la gonade, les matériaux nécessaires à l'édification de l'oothèque sont sécrétés normalement.

En résumé, la rickettsiose des Orthoptères perturbe la plupart des fonctions biologiques, ralentit la croissance et la maturation des cellules germinales mâles, entraîne la stérilité des femelles, et parfois des mâles, sensibilise les Insectes à d'autres agents pathogènes. L'issue normale de cette maladie est la mort de l'Insecte. Il serait évidemment souhaitable que la physiologie comparée des Insectes sains et malades puisse être, un jour, étudiée. De même, il serait intéressant que soit déterminée l'origine géographique de l'épizootie et que soient étudiées les répercussions écologiques de la rickettsiose. Pour le microbiologiste, *Rickettsiella grylli* constituera un matériel éminemment favorable, en raison de la facilité avec laquelle peuvent être obtenues de véritables « cultures *in vivo* » sur des Insectes divers dont l'élevage au laboratoire est aisé. La quantité prodigieuse de germes disponibles, dans ces conditions, ajoute un avantage sérieux pour ce genre d'études.

RÉSUMÉ

L'étude des relations susceptibles de s'établir entre des micro-organismes et un certain nombre d'Orthoptères a été abordée par les techniques anatomiques, histologiques et biochimiques. Ont été analysés, un cas de symbiose et un cas de pathologie.

ÉTUDE DE LA SYMBIOSE ENTRE GRYLLOIDEA ET MICRO-ORGANISMES INTESTINAUX

1° De tous les Orthoptères, seuls les *Grylloidea* possèdent une flore intestinale très développée et localisée dans un segment intestinal de structure particulière, le *segment à villosités*.

2° Des arguments anatomiques, histologiques, embryologiques et histophysiologiques démontrent que ce segment n'appartient pas au mésentéron comme on l'a cru jusqu'alors, mais au proctodeum. Il représente, en fait, l'*iléon*.

3° L'iléon est bifide et chacune de ses branches est hautement spécialisée. Celle qui est incorporée au tube digestif est différenciée en un segment à bactéries, l'autre dénommée « uretère » est incorporée à l'appareil excréteur. La première est pourvue de papilles comparables à celles de la poche à bactéries des Lamellicornes (Coléoptères), tandis que la seconde a pour rôle de déverser les produits de l'excrétion au-delà du segment à bactéries, à la limite antérieure du côlon. Cette interprétation est en accord avec le principe des connexions.

4° L'abondant fluide de couleur brune, situé entre l'épithélium intestinal et la membrane péritrophique, représente une culture de micro-organismes et non un produit de la digestion. Des papilles et des ornementations chitineuses éloignent la membrane péritrophique de la paroi intestinale et permettent également l'implantation des foyers bactériens.

5° Dans les autres groupes d'Orthoptères, il existe également des bactéries, mais elles sont libres dans la lumière du tube digestif et mêlées aux aliments. Elles sont plus nombreuses chez les *Tettigonioidea* que chez les *Acridoidea*.

6° La flore intestinale des grillons est très pauvre en formes nucléées. Elle comprend essentiellement des bactéries dont six espèces ont été isolées et déterminées (VIERNE & MEYNADIER).

7° A l'éclosion, le segment à villosités des grillons ne contient pas de micro-organismes. La flore n'est mise en place qu'au cours des quatre premiers jours de la vie post-embryonnaire.

8° La présence de la flore intestinale est permanente. Elle ne diminue pas au cours du jeûne et ne subit que de faibles fluctuations au cours du transit alimentaire. Presque totalement rejetée au cours de la mue, sa reconstitution rapide est assurée à partir de nappes bactériennes demeurées dans la lumière intestinale. Chez *G. campestris*, espèce à diapause nymphale, certaines bactéries sporulent pendant l'hiver.

9° Les traitements aux antibiotiques ne provoquent qu'une défaunation partielle. La défaunation totale nécessite la mise en élevage aseptique, sur milieu artificiel stérilisé, d'œufs dont le chorion a été désinfecté.

10° La croissance et la reproduction des grillons axéniques sont normales, au moins pendant une génération.

11° Les cellules germinales ne sont pas impliquées dans la transmission des micro-organismes d'une génération à l'autre. La contamination est assurée par le chorion de l'œuf, selon un mécanisme qui fait intervenir le spermatophore et les glandes sternales du mâle, ainsi que certaines pollutions introduites par la femelle au cours de l'oviposition. Les formes bactériennes ingérées en même temps que la nourriture ne participent que pour une faible part à la constitution de la flore.

12° L'intervention des micro-organismes intestinaux dans certains processus métaboliques a pu être démontrée.

— Les bactéries réduisent les sulfates et assurent la conversion du soufre minéral en soufre organique. Cette conversion est importante chez les espèces à segment bactérien, faible ou nulle chez les autres. Elle est abolie par la défaunation;

— Les bactéries assurent la transsulfuration de la cystéine en méthionine, chez les *Grylloidea* seulement, et dans la mesure où la flore est intacte;

— Les bactéries, chez le grillon, dégradent la cellulose et la rendent assimilable pour l'hôte;

Les bactéries métabolisent l'urée, chez les espèces à segment bactérien:

— Le rôle des micro-organismes dans ces mécanismes biochimiques est confirmé par la reproductibilité *in vitro*, de certaines de ces réactions et par l'isolement de souches assurant la réduction des sulfates et la dégradation de la cellulose.

13° Les métabolites provenant de l'action bactérienne sont libérés dans le milieu de culture naturel de l'iléon, et de là, passent dans l'hémolymphe. L'absorption est vraisemblablement assurée par les cellules de l'iléon situées hors des papilles, cellules qui conservent, malgré la spécialisation de l'organe, les caractères absorbants de toute cellule proctodéale.

14° Les bactéries sont en mesure d'utiliser certains métabolites fournis par l'hôte.

15° La symbiose qui existe dans les conditions naturelles, entre les Grylloidea et des micro-organismes, n'a pas un caractère obligatoire. Les germes n'apportent sans doute que des métabolites d'appoint dont l'intervention dans la nutrition de l'Insecte doit être mineure. Il est toutefois possible qu'ils participent à des fermentations ou à des synthèses, de stérols ou de vitamines par exemple, dont les carences ne deviendraient sensibles qu'après plusieurs générations d'axéniques.

Étude de la rickettsiose a rickettsiella grylli Vago & Martoja

1° *Rickettsiella grylli*, agent pathogène découvert dans plusieurs espèces de *Gryllus*, a pu être transmise à 7 autres genres d'Orthoptères appartenant aux *Grylloidea*, aux *Tettigonioidea* et aux *Acridoidea*. En dehors des conditions expérimentales, la contagion est réalisée par divers agents vecteurs, par le cannibalisme et la nécrophagie. Il n'y a pas de transmission aux descendants par les cellules germinales.

2° La sensibilité des divers Orthoptères et la durée de survie des individus contaminés, varient suivant l'espèce, l'âge et les conditions d'élevage de l'hôte.

3° La rickettsiose s'accompagne de symptômes externes qui diffèrent selon les espèces : chez les grillons, elle provoque un gonflement prononcé de l'abdomen; chez *Schistocerca*, elle modifie la pigmentation.

4° La rickettsiose ralenti la croissance des larves. Chez les adultes la vitalité et le comportement sexuel sont normaux, mais la plupart des femelles ne pondent pas ou déposent des oothèques dépourvues d'œufs.

5° Le développement des rickettsies est exclusivement intra-cytoplasmique et il n'y a pas formation de pseudo-cristaux.

6° Le premier des organes atteints est le corps gras. Les œnocytes, les testicules, les glandes salivaires, le système neuro-endocrine ne sont envahis qu'ultérieurement et leur dégradation est plus ou moins prononcée. L'infection des autres organes est inconstante ou nulle. Les rickettsies ne détruisent l'ovaire que chez les *Tettigonioidea*.

7° Bien qu'échappant à l'infection directe, certains organes présentent des réactions secondaires. Ainsi doivent être interpétées les tumeurs du tube digestif et les images de dégénérescence de l'ovaire des grillons et des Acridiens.

8° Chez certaines espèces, les limites entre divers tissus envahis disparaissent, et il se constitue une sorte de tissu de synthèse, le « tissu opalescent ».

9° La stérilité est fréquente dans les deux sexes. Pour les mâles, elle résulte d'une destruction de la gonade ou d'un retard de la spermatogenèse; chez les Ensifères, s'y ajoute une inhibition du développement des glandes annexes nécessaires à l'élaboration du spermatophore. Pour les femelles, la stérilité est due à des perturbations de la vitellogenèse et à une dégnérescence des follicules. Chez les Acridiens, l'oothèque est néanmoins sécrétée. Enfin, chez les *Tettigonioidea*, il y a destruction de l'ovaire.

10° L'apparition des caractères sexuels secondaires internes (corps gras femelle, glandes annexes mâles) est inhibée chez les Ensifères et non chez les Caelifères. L'étude de la rickettsiose permet donc d'introduire la notion d'une différence réactionnelle fondamentale entre les deux sous-ordres. Elle permet également de préciser que l'apparition des caractères sexuels externes et internes n'obéit pas, chez les Ensifères, au même déterminisme. Les organes atteints par la maladie sont trop nombreux pour que les mécanismes impliqués dans ces phénomènes aient pu être élucidés.

11° *Rickettsiella grylli* est sensible à divers antibiotiques. Le traitement rétablit, dans les deux sexes, des conditions biologiques quasi normales. La fécondité réapparaît chez les femelles, mais non chez les mâles, le testicule constituant le foyer microbien le plus résistant. Malgré cette atteinte persistante des testicules, la différenciation des tubes glandulaires annexes de l'appareil génital mâle s'amorce, chez les individus en voie de guérison.

SUMMARY

The study of relations susceptible to settle between micro-organisms and a determined number of *Orthoptera* were treated by the anatomical, histological and biochemical technics. One case of symbiosis and one of pathology were analysed.

And important and localized intestinal flora is living only in *Grylloidea*. Many species of *coccobacilli* and *bacilli* exist in it. This flora begins in the first days of larval life; then it is permanent. Intestinal germs are reduced by antibiotics; axenic crickets are obtained by aseptic breeding of embryos and their development is normal during one generation. The intestinal bacteries of *Grylloidea* interfere in the reduction of sulphates, conversion of cysteine in methionine, use if urea and likely in the degradation of cellulose.

Rickettsiella grylli Vago & Martoja is a pathogenic germ for the most part of species of *Orthoptera*. The sensibility of contamined Insects and the time of their survival are in relation with species, age and conditions of breeding of the host. The rickettsiose is accompanied with morphological and histological symptoms wich are described in many species of *Grylloidea*, *Acridoidea* and *Tettigonioidea*. The transmission of germ is not made by the way of gonades, but *per os*.

The importance of symbiotic or pathogenic germs in the physiology of *Orthoptera* is discussed.

BIBLIOGRAPHIE

Ander, K., 1939. — Vergleichend-Anatomische und phylogenetische Studien über die Ensiferen (Saltatoria). — *Opuscula entomologica, suppl.*, **2**, p. 1-306.

Andrew, B. J., 1930. — Method and rate of protozoan refaunation in the Termite *Termopsis angusticollis* Hagen. — *Publ. Calif. Univ. Zool.*, **33**, p. 449-470.

Ashhurst, D. E., 1959. — The connective tissue sheath of the Locust nervous system : a histochemical study. — *Quart. J. Micr. Sc.*, **100**, p. 401-412.

Ashhurst, D. E., 1961. — An acid mucopolysaccharide in cockroach ganglion. — *Nature*, **191**, p. 1224-5.

Bacetti, B., 1960. — Ricerche sull'ultrastruttura dell'intestino degli insetti. I. L'ileo di un ortottera adulto. — *Redia*, **45**, p. 263-278.

Bacetti, B., 1962. — Ricerche sull'ultrastruttura dell'intestino degli insetti. III. Il mesentero ed il colon nell'operaio di *Reticulitermes lucifugus* Rossi. — *Atti IV Congresso UIEIS, Pavia*, **11**, p. 230-255.

Bacetti, B., 1962. — Ricerche sull'ultrastruttura dell'intestino degli insetti. IV. Le papille rettali in un ortottero adulto. — *Redia*, **47**, p. 105-118.

Baines, J., 1956. — The role of the symbiotic bacteria in the nutrition of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). — *J. exper. Biol.*, **33**, p. 533-541.

Barnett, R. J. & Seligman, A. M., 1952. — Histochemical demonstration of protein-bound sulfhydril groups. — *Science*, **116**, p. 323-327.

Berkaloff, A., 1960. — Contribution à l'étude des tubes de Malpighi et de l'excrétion chez les Insectes. Observations au microscope électronique. — *Ann. Sc. nat., Zool.*, **12** sér., p. 871-947.

Berlese, A., 1909. — Osservazionni sulla anatomia descrittiva del *Gryllus campestris*. *Atti Soc. Ven. Trent., Padova*, **2** (2).

Berlese, A., 1909. — Gli Insetti, Milan.

Bescol-Liversac, J., 1958. — Les mucopolysaccharides étudiés par la fixation du radiosulfate. — *Ann. Histochimie*, **3** (4), p. 309-365.

Blewett, M. & Fraenkel, G., 1944. — Intracellular symbiosis and vitamin requirements of two Insects, *Lasioderma serricorna* and *Sitrodrepa panicea*. — *Proc. Roy. Soc., London, B*, **132**, p. 212-221.

Block, R. J. & Henry, S. M., 1961. — Metabolism of the sulphur aminoacids and of sulfate in *Blatella germanica*. — *Nature*, **4786** (191), p. 392-393.

Boné, G. & Koch, J. H., 1942. — Le rôle des tubes de Malpighi et du rectum dans la régulation ionique chez les Insectes. — *Ann. Soc. Roy. Zool., Belgique*, **73**, p. 73-87.

Bordas, L., 1897. — Le tube digestif des Orthoptères. — *C. R. Acad. Sc.*, **124**, p. 46-48.

Bordas, L., 1898. — L'appareil digestif des Orthoptères (études morphologiques, histologiques et physiologiques de cet organe et son importance pour la classification des Orthoptères). — *Ann. Sc. nat., Zool.*, **5**, p. 1-208.

Bordas, L., 1901. — Insertion des tubes de Malpighi chez les *Gryllidae*. — *Bull. Soc. ent. Fr.*, **15**, p. 227-228.

Bordas, L., 1902. — Structure des tubes de Malpighi, du réceptacle urinaire et du canal excréteur (urètre) des *Gryllidae*. — *Bull. Soc. ent. Fr.*, **16**, p. 272-273.

Bordas, L., 1913. — Les tubes de Malpighi et le réservoir urinaire des *Gryllidae*. — *Bull. Soc. Zool. Fr.*, **38**, p. 213-217.

Bouthier, A., 1964. — Développement post embryonnaire du tractus génital et des *genitalia* mâles chez *Gryllus posticus* Walk. (Orthoptères, *Gryllidae*). — *Arch. Zool. exp. et gén.*, **103** (1), p. 30-55.

Braesch, S., 1950. — Sur les glandes annexes de la chambre périvulvaire de certains Gryllides. — *C. R. Acad. Sc.*, **230**, p. 329-331.

Bready, J. K. & Friedman, S., 1963. — The nutritional requirements of termites in axenic cultures. I. Sterilization of eggs of *Reticulitermes flavipes* and the requirements of first-instar nymphs. — *Ann. entom. Soc. Amer.*, **56** (5), p. 703-706.

Bromfield, S. M., 1953. — Sulphate reduction in partially sterilised soil exposed to air. — *J. Gen. Microbiol.*, **8**, p. 378.

Brooks, M. A. & Richards, A. G., 1955. — Nature and significance of intracellular bacteroids in cockroaches. I. Production of aposymbiotic cockroaches. — *Biol. Bull.*, **109**, p. 22-39.

Buddenbrock, W. von, 1956. — Vergleichende Physiologie. Ernährung und Verdauung. — Birkhaüser édit., Bâle, **3**, p. 187-240.

Carpentier, F., 1937. — Sur le tube digestif des Tridactyloides. *Bull. et Ann. Soc. entom. Belg.*, **77**, p. 283-291.

Chapeville, F. & Fromageot, P., 1956. — Utilisation du sulfate ^{35}S pour la synthèse de la taurine dans l'embryon de poulet. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **38**, p. 1153-1158.

Chapeville, F. & Fromageot, P., 1957. — Formation de sulfite, d'acide cystéique et de taurine à partir de sulfate par l'embryon de poulet. — *C. R. Acad. Sc.*, **244**, p. 388-391.

Chauvin, R., 1941. — Contribution à l'étude physiologique du Criquet pèlerin et du déterminisme des phénomènes grégaires. — *Ann. Soc. entom. Fr.*, **90**, p. 133-272.

Chauvin, R., 1956. — Physiologie de l'Insecte, I.N.R.A. édit., Paris.

Chopard, L., 1949. — Ordre des Orthoptères, dans Grassé, P. P., Traité de Zoologie, **9**, p. 617-722, Masson, Paris.

Chun, C., 1876. — Unter den Bau, die Entwicklung und physiologische Bedeutung der Rectaldrüsen bei den Insekten. — *Abh. der Senkenb. Naturforsch. Gesell.*, Bd **10**.

Clayton, R. B., 1960. — The role of intestinal symbionts in the sterol metabolism of *Blatella germanica*. — *J. biol. Chem.*, **235** (12), p. 3421-3425.

Cleveland, L. R., 1923. — Symbiosis between Termites and their intestinal Protozoa. — *Proc. Nat. Acad. Sc. Washington*, **9**, p. 424-428.

Cleveland, L. R., 1931. — The effects of molting on the Protozoa of *Cryptocercus*. — *Anat. Rec.*, **51**, p. 84.

Cleveland, L. R., Hall, S. R., Sanders, E. P., Collier, J., 1934. — The wood-feeding roach *Cryptocercus*, its Protozoa and the symbiosis between Protozoa and Roach. — *Mem. Amer. Acad. Arts Sc., Boston*, **17**, (2), p. 185-342.

Conklin, G., 1903. — Amitosis in the egg follicle of the cricket. — *Amer. Nat.*, **37**, p. 667-675.

Cools, A. & Jeuniaux, C., 1961. — Fermentation de la cellulose et absorption d'acides gras volatils au niveau du caecum du Lapin. — *Arch. Inst. Physiol. et Bioch.*, **69** (1), p. 1-8.

Coupland, R. E., 1957. — Observations on the normal histology and histochemistry of the fat body of the locust (*Schistocerca gregaria*). — *J. exper. Biol.*, **34** (2), p. 290-296.

Cousin, G., 1938. — La néoténie chez *Gryllus campestris* et ses hybrides. — *Bull. biol. Fr. Belg.*, **72**, p. 79-118.

Couturier, S., Possompès, B. & Couturier, A., 1961. — Observations sur l'iléon des *Melolonthinae* (Coléoptères, *Scarabidae*). — *C. R. Acad. Sc.*, **252**, p. 3870-3872.

Couturier, S., 1961. — Recherches anatomiques et histologiques sur l'iléon des *Melolonthinae* (Coléoptères *Scarabidae*). — *Ann. Épiphyties*, **12** (3), p. 317-346.

Cuénot, L., 1896. — Études physiologiques sur les Orthoptères. — *Arch. Biol.*, **14**, p. 293-341.

Dadd, R. H., 1957. — Ascorbic acid and carotene in the nutrition of the desert locust, *Schistocerca gregaria* Forsk. — *Nature*, **179**, p. 427-428.

Dadd, R. H., 1960. — The nutritional requirements of locusts. I. Development of synthetic diets. — *J. Insect Physiol.*, **4**, p. 319-347.

Dadd, R. H., 1960. — The nutritional requirements of locusts. III. Carbohydrate requirements and utilization. — *J. Insect Physiol.*, **5**, p. 301-316.

Dadd, R. H., 1961. — The nutritional requirements of locusts. IV. Requirements for vitamins of the B complex. — *J. Insect Physiol.*, **6**, p. 1-12.

Dadd, R. H., 1961. — The nutritional requirements of locusts. V. Observations on essential fatty acids, chlorophyll, nutritional salt mixtures, and the protein or aminoacid components of synthetic diets. — *J. Insect Physiol.*, **6**, p. 126-145.

Dasgupta, B. & Ray, H. N., 1956. — Observations on the « corpus luteum » and the « NR bodies » in the female gonads of bed-bug. — *Proc. Zool. Soc. Bengal*, **9**, p. 55-63.

Day, M. F., 1949. — The occurence of mucoid substances in Insects. — *Austr. J. Sc. Res.*, **2**, p. 421-427.

Daya Bhanu, 1961. — Modifications in the fecondity and life span of the moth *Corcyra cephalonica* Staint. receiving dietary antibiotics in the larval stages. — *Experientia*, **17** (10), p. 468.

Duboscq, O. & Grassé, P. P., 1927. — Les Flagellés et Schizophytes de *Calotermes* (*Glyptotermes*) *iridipennis* Frogg. — *Arch. Zool. exper. et gén.*, **66**, p. 451-496.

Duboscq, O. & Grassé, P. P., 1934. — Notes sur les Protistes parasites des Termites de France. VII. Sur les *Trimitus* de *Calotermes flavicollis* Rossi. VIII. Sur *Microrhopalodina inflata* Grassi. — *Arch. Zool. exper. et gén.*, **75**, p. 615-627.

Dubost, G., 1963. — Un Ruminant à régime alimentaire partiellement carné : le Chevrotain aquatique (*Hyemoschus aquaticus* Ogilby). — *C. R. Acad. Sc.*, **256** (6), p. 1359-1360.

Dufour, L., 1841. — Recherches anatomiques et physiologiques sur les Orthoptères, les Hyménoptères et les Névroptères. — *Mém. Acad. Roy. Sc. de l'Institut. de Fr.*, **17**, p. 265-647.

Dumas, J. & Coll., 1951. — Bactériologie médicale. — Flammarion édit., Paris.

Dumas, N. & Hurpin, B., 1959. — Premières études sur la localisation de la rickettsie de la maladie bleue des *Melolontha*. — *C. R. Soc. Biol.*, **153**, p. 931.

Dupuis, C., 1963. — Essai monographique sur les *Phasiinae* (Diptères Tachinaires parasites d'Hétéroptères). — *Mém. Muséum Hist. nat., A. Zool.*, **26**.

Durand, M., 1961. — L'acide desoxyribonucléique (ADN) dans les gamètes et au cours des premiers stades de l'embryogénie des Gryllides. — *Bull. Biol. Fr. Belg.*, **95** (1), p. 28-123.

Dutky, S. R. & Gooden, E. L., 1952. — *Coxiella popiliae*, n. sp., a rickettsia causing blue disease of Japanese beetle larvae. — *J. Bacteriol.*, **63**, p. 743-750.

Dziewiatkowski, D. D., 1946. — Conversion of sulfide sulfur to cystine sulfur in the rat, with use of radioactive sulfur. — *J. Biol. Chem.*, **164**, p. 165-171.

Dziewiatkowski, D. D., 1951. — Isolation of chondroïtin sulfate—^{35}S from articular cartilage of rats. — *J. Biol. Chem.*, **189**, p. 187-190.

Dziewiatkowski, D. D., 1954. — Utilisation of sulphate sulfur in the rat for the synthesis of cystine. — *J. Biol. Chem.*, **207**. p. 181.

Échard, G., 1962. — Développement postembryonnaire de l'ovaire et du testicule chez *Gryllus domesticus* (L), Orthoptère Gryllide. — *Bull. Soc. Zool. Fr.*, **87** (1), p. 52-70.

Elvehjem, C.A., 1948. — Nutritional significance of intestinal flora. — *Federation Proc.*, **7**, p. 410-417.

Emery, R. S., Smith, C. K. & Huffman, C.F., 1956. — Conference on Radio-isotopes, East Lansing, Michigan.

Engfeldt, B., Engstrom, A. & Bostrom, H., 1954. — The localisation of radiosulfate in bone tissue. — *Exp. Cell. Res.*, **6** (1), p. 251-253.

Evans, W. A. & Payne, D. W., 1964. — Carbohydrates of the alimentary tract of the desert locust, *Schistocerca gregaria* Forsk. — *J. Insect Physiol.*, **10** (5), p. 657-848.

Favard-Séréno, C. & Durand, M., 1963. — L'utilisation des nucléosides dans l'ovaire du Grillon et ses variations au cours de l'ovogenèse. I. Incorporation dans l'ARN. — *Develop. Biol.*, **6** (2), p. 184-205.

Feigl, F., 1954. — Spot tests. II. Organic applications. — Elsevier édit., Amsterdam.

Feir, D., 1963. — Midgut bacteria of *Oncopeltus fasciatus* (*Hemiptera, Lygaeidae*). — *An. Entomol. Soc.*, **56** (6), p. 829-830.

Fink, R. Z., 1952. — Morphologische und physiologische Untersuchungen an den intrazellularen Symbionten von *Pseudococcus citri* Risso. — *Z. Morphol. Okol. Tiere*, **41**, p. 78-146.

Fisher, E. R. & Lillie, R. D., 1954. — The effect of methylation on basophilia. — *J. Histochem. Cytochem.*, **2**, p. 81-87.

Fisher, J. M., 1963. — Production of host endocrine substances by parasites. — *Ann. New York Acad. Sc.*, **113** (1), p. 63-73.

Fisher, F. M. & Sandborn, R. C., 1964. — Nosema as a source of juvenile hormone in parasitized Insects. — *Biol. Bull.*, **126** (2), p. 235-252.

Fletcher, F. & Haub, G. J., 1933. — Digestion in Blowfly larvae *Phormia regina* Meigen, used in the treatment of osteomyelitis. — *Ohio J. Sc.*, **33**, p. 101-109.

Franco-Browder, S., Rydt, J. de & Dorfman, A., 1963. — The identification of sulfated mucopolysaccharide in chick embryos, stages 11-23. — *Proc. Nation. Acad. Sc.*, **49** (5), p. 643-647.

Frenzel, J., 1886. — Einiges über den Mitteldarm der Insekten sowie über Epithelregeneration. — *Ark. für Mikros. Anat.*, **26**, p. 229-306.

Fromageot, C., 1947. — Oxydation of organic sulfur in animals. — *Advances in Enzymology*, **7**, p. 369-407.

Fuzeau-Braesch, S., 1963. — Étude de la pigmentation tégumentaire des Insectes à l'aide des radio-éléments, dans Radiation and radio-isotopes applied to Insects of agricultural importance. — *Intern. Atomic Energy, Vienne*, p. 289-297.

Fuzeau-Braesch, S. & Ros, A. M., 1965. — Effet de groupe et température dans la croissance d'un Insecte, *Gryllus bimaculatus* (Orthoptère, Gryllides). — *C. R. Acad. Sc.*, **260** (3), p. 987-990.

Gabe, M., 1962. — Polysaccharide, dans Graumann, W. & Neumann, K., Handbuch der Histochemie, Fischer édit., Stuttgart, **2** (1), p. 209-253.

Gabe, M. & Martoja-Pierson, M., 1957. — Sur une méthode de coloration trichrome en un temps sans différenciation. — *Bull. Micr. Appl.*, **2** (7), p. 60-63.

Geigy, R., Halff, L. A. & Kocher, V., 1954. — L'acide folique comme élément important dans la symbiose intestinale de *Triatoma infestans*. — *Acta tropica*, **11** (2), p. 163-166.

Girardie, A., 1963. — Rôle de la *pars intercerebralis* chez *Locusta migratoria* L. (Orthoptère). — *Proc.* XVIth *Intern. Congr. Zool.*, **2**, p. 117.

Glenner, G. G., 1957. — The histochemical demonstration of indole derivates by the rosindole reaction of E. Fischer. — *J. Histochem Cytochem.*, **5**, p. 297-304.

Gomori, G., 1952. — Microscopic Histochemistry, Principles and Practice. — Univ. Chicago Press édit.

Gomori, G., 1956. — Histochemical methods for protein-bound sulfhydril and disulphide groups. — *Quart. J. Micr. Sc.*, **97**, p. 1-9.

Goodhue, D., 1963. — Some differences in the passage of food through the intestine of the desert and migratory locusts. — *Nature*, **200** (4903), p. 288-289.

Gordon, H. T., 1959. — Minimal nutritional requirements of the German roach, *Blatella germanica* L. — *Ann. New York Acad. Sc.*, **77**, p. 290-351.

Gothié, S., 1955. — Répartition du ^{32}P et du ^{35}S dans le tractus digestif et génital de la Lapine. — *Sem. Hôp.*, **31**, p. 305-306.

Grassé, P. P. & Noirot, Ch., 1945. — La transmission des Flagellés symbiotiques et les aliments des Termites. — *Bull. Biol. Fr. Belg.*, **79**, p. 273-292.

Grassé, P. P., 1949. — Ordre des Isoptères ou Termites, dans Traité de Zoologie, **9**, p. 408-544, Masson, Paris.

Grassé, P. P., 1952. — La symbiose Flagellés-Termites, dans Traité de Zoologie, p. 945-962, Masson édit., Paris.

Grassi, B. & Foa, A., 1911. — Intorno ai Protozoi dei Termitidi. — *Rendiconti d. reale Acad. Lincei, V, class. sc. fis.*, **20**, 1° sem.

Haines, I. M., Henry, S. M. & Block, R. J., 1960. — The sulfur metabolism in Insects. V. The ability of Insects to use sulfate in the synthesis of Methionine. — *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, **20**, p. 363-364.

Hall, I. M. & Badgley, M. E., 1957. — A rickettsial disease of species of *Stethorus* caused by *Rickettsiella stethorae*, n. sp. — *J. Bacteriol.*, **74**, p. 452-455.

Harker, J. E., 1958. — Experimental production of midgut tumors in *Periplaneta americana* L. *J. exper. Biol.*, **35**, p. 251-259.

Harker, J. E., 1963. — Tumors, dans Steinhaus, E. A., Insect Pathology, an advanced Treatise, p. 191-213, *Acad. Press* édit., *New York*.

Hellmuth, G., 1956. — Untersuchungen zur Bakteriensymbiose der Trypetiden (*Diptera*). — *Z. Morphol. Okol. Tiere*, **44** (6), p. 483-517.

Henneguy, F., 1904. — Les Insectes, Morphologie, reproduction, embryogénie, Masson édit., Paris.

Heymons, R., 1895. — Die Embryonalentwicklung von Dermapteren und Orthopteren unter besonder Berücksichtung der Keimblätterbildung. Monographisch Bearbeitet, Jena.

Henderickx, H., 1960. — La dégradation des protéines alimentaires dans le rumen. — *Bull. Inst. agron. Gembloux*, **2**, p. 669-680.

Henry, S. M. & Block, R. J., 1960. — The sulfur metabolism of Insects. IV. The conversion of inorganic sulfate to organic sulfur compounds in cockroaches. The role of intracellular symbionts. — *Contr. Boyce Thompson Inst.*, **20**, p. 317-329.

Highnam, K. C., Lusis, O. & Hill, L., 1963. — The role of the *corpora allata* during oocyte growth in the desert locust, *Schistocerca gregaria* Forsk. — *J. Insect Physiol.*, **9**, p. 587-596.

Hilchey, J. D., 1953. — Studies on the qualitative requirements of *Blatella germanica* for aminoacids under aseptic conditions. — *Contr. Boyce Thompson Inst.*, **17**, p. 203-219.

Hilchey, J. D., 1956. — The relationship between Nutrition and Intermediary Metabolism in Studies on the Sulfur Amino acids in Insects. — *Proc. Xth Congr. Entom., Montreal*, **2**, p. 127-134.

Hilchey, J. D., Block, R. J., Miller, L. P. & Weed, R. M., 1955. The sulfur metabolism in Insects. I. The utilisation of sulfate for the formation of Cystine and Methionine by the german cockroach *Blatella germanica* L. — *Contr. Boyce Thompson Inst.*, **18**, p. 109-123.

Hill, L., 1963. — Endocrine control of protein synthesis in female desert locusts (*Schistocerca gregaria*). — *J. Endocr.*, **26**, p. 17-18.

Himes, M. & Morrimer, L., 1956. — A triple stain for desoxyribonucleic acid, polysaccharides and proteins. — *Stain Technol.*, **31** (2), p. 67-70.

Hodge, C., 1939. — The anatomy and histology of the alimentary tract of *Locusta migratoria* L. — *J. Morphol.*, **64** (3), p. 375-397.

House, H. L., 1949. — Nutritional studies with *Blatella germanica* L. reared under aseptic conditions. II. A chemically defined diet. — *Canad. Entom.*, **81**, p. 105-112.

House, H. L., 1949. — Nutritional studies with *Blatella germanica* L. reared under aseptic conditions. III. Five essential aminoacids. — *Canad. Entom.*, **81**, p. 133-139.

Huger, A., 1958. — Histopathologie des Rickettsiose von *Tipula paludosa* Meig. — *Koll. Arbgr. Insektenpathol. und mikrobiol. Bekämpfung*, p. 6-7.

Huger, A., 1959. Histological observations on the development of cristalline inclusions of the rickettsial disease of *Tipula paludosa* Meig. — *J. Insect Pathol.*, **1**, p. 60-66.

Huger, A., 1962. — Zur Genese der Begleitkristalle bei *Rickettsiella* Infektionen von Insekten. — *Naturwissenschaften*, **49**, p. 358.

Huger, A., 1964. — Eine Rickettsiose der Orientalischen Schabe, *Blatta orientalis* L., verursacht durch *Rickettsiella blattae* Nov. sp. — *Naturwissenschaften*, **51** (1), p. 22.

Hungate, R. E., 1943. — Quantitative analyses of the cellulose fermentations by the termite protozoa. — *Ann. Entom. Soc. Am.*, **36**, p. 730-739.

Hurpin, B., 1962. — Alimentation, développement et fécondité chez les Insectes. — *Ann. Nutr. Alim.*, **16** (6), p. 153-200.

Hurpin, B. & Vago, C., 1958. — Les maladies du Hanneton commun (*Melolontha melolontha* L.) (Coléoptère *Scarabaeidae*). — *Entomophaga*, **3**, p. 285-330.

Ito Hirowo, 1924. — Contribution histologique et physiologique à l'étude des annexes des organes génitaux des Orthoptères. — *Arch. Anat. Micr.*, **20** (3), p. 343-460.

Jarry, D. T., 1964. — Les Oxyurides de quelques Arthropodes du Midi de la France. — *Ann. Parasitol. hum. et comp.*, **39** (4), p. 381-508.

Joly, P., 1962. — L'endocrinologie des Invertébrés. — *Experientia*, **18** (481), p. 2-16.

Kawiak, J., 1963. — Presence of chondroïtin sulfate in chondrocytes. I. Histochemical and autoradiographic observations. — *Acta Histochem.*, **15**, p. 153-160.

Khan, Mumtaz Ahmad, 1964. — Histological changes related to the secretion of digestive enzymes in the mid-gut and caeca of *Locusta migratoria* L. — Proc. Roy. Ent. Soc., 39, p. 118-124.

Kitts, W. D. & Underkofler, L. A., 1954. — Digestion by rumen micro-organisms. Hydrolytic products of cellulose and the cellulolytic enzyms. — *J. Agr. Food. Chem.*, **2**, p. 639-645.

Koch, A., 1963. — On the role of the symbiots in wood-destroying Insects. — *Recent Progr. Microbiol. Sympos.*, 8th *Intern. Congr. Microbiol., Montréal* 1962, *Univ. Toronto Press édit.*, p. 151-161.

Kovoor, J., 1959. — Anatomie du tractus intestinal dans le genre *Microcerotermes* (Silvestri) (*Isoptera, Termitidae*). — *Bull. Soc. Zool. Fr.*, **84**, p. 445-457.

Krieg, A., 1963. — Rickettsiae and rickettsioses, dans Steinhaus, E. A., Insect Pathology, an advanced Treatise, *Acad. Press édit., New York*, p. 577-617.

Lasker, R. & Giese, A.C., 1956. — Cellulose digestion by the silver-fish *Ctenolepisma lineata*. - *J. Exp. Biol.*, **33**, p. 542-553.

Lauverjat, S., 1964. — Caractères histochimiques de la sécrétion dans les voies génitales femelles et données expérimentales sur l'origine de l'oothèque, chez *Locusta migratoria* R. & F. (Insecte, Orthoptère). — *C. R. Acad. Sc.*, **258**, p. 4348-4351.

Lederer, E. & Coll., 1959. — Chromatographie en chimie organique et biologique. — Masson édit., Paris.

Léger, L. & Dubosco, O., 1900. — Notes biologiques sur les Grillons. — *Arch. Zool. Exper. et Gén., sér.* 3, **8**, p. 49-56.

Lillie, R. D., 1957. — Adaptation of the Morel-Sisley Protein Diazotation to the histochemical demonstration of Protein Bound Tyrosine. — *J. Histochem. Cytochem.*, **5**, p. 528-532.

Lison, L., 1960. — Histochimie et Cytochimie animales. — Gauthier-Villars édit., Paris.

Loosli, J. K., Williams, H. H., Thomas, N. E., Ferris, H. & Maynard, L. A., 1949. — Synthesis of aminoacids in the rumen. — *Science*, **110**, p. 144-145.

Luckey, T. D., 1963. — Germ-free life and Gnotobiology. — *Acad. Press édit., New York.*

Lusis, O., 1963. — The histology and histochemistry of development and resorption in the terminal oocytes of the desert locust *Schistocerca gregaria*. — *Quart. J. Micr. Sc.*, **104**, p. 57-68.

Mc Cay, C. M., 1938. — The nutritional requirements of *Blatella germanica*. — *Physiol. Zool.*, **11**, p. 89-103.

Mc Elroy, L. W. & Goss, H., 1939. — Report on four members of the vitamin B complex synthetised in the rumen of the sheep. — *J. Biol. Chem.*, **130**, p. 437-438.

Mc Farlane, J. E., 1964. — The protein requirements of the house cricket, *Acheta domesticus* L. — *Canad. J. Zool.*, **42** (4), p. 645-647.

Machalin, L. J., Pearson, P. P. & Denton, C. A., 1955. — The utilization of sulfate sulfur for the synthesis of taurine in the developing chick embryo. — *J. Biol. Chem.*, **212**, p. 469-475.

Mahmoud Hafez Ibrahim, M. M., 1959. — Histology of the alimentary canal of *Acrida pellucida* Klug. — *Bull. Soc. Entom. Egypte*, **43**, p. 115-131.

Maillet, P. L. & Folliot, R., 1964. — Sur le transport de corpuscules d'allure rickettsienne par un spermatozoïde. Étude au microscope électronique. — *C. R. Acad. Sc.*, **259** (16), p. 2717-2720.

Mansour, K. & Mansour-bek, J. J., 1937. — The cellulose and other enzymes of the larvae of *Stromatium fulvum* Villiers. — *Enzymologia*, **4**, p. 1-6.

Marschall, K. J., 1963. — The histology of normal and diseased reserve tissues in rhinoceros beetles (*Oryctes* sp.). — *J. Insect Pathol.*, **5** (1), p. 39-55.

Martignoni, M. E., 1964. — Pathophysiology in the Insect. — *Ann. Rev. Entom.*, **9**, p. 179-206.

Martoja, R., 1959. — Données cytologiques et histochimiques sur les tubes de Malpighi et leur sécrétion muqueuse chez *Locusta migratoria* R & F. (Orthoptère, Acridien). — *Acta histochem.*, **6**, p. 185-217.

Martoja, R., 1961. — Signification anatomique et biologique du segment à villosités de l'intestin des *Grylloidea* (Orthoptères). *C. R. Acad. Sc.*, **253**, p. 2759-2761.

Martoja, R., 1961. — Caractères histologiques du segment muqueux de l'appareil excréteur des Orthoptères. — *C. R. Acad. Sc.*, **253**, p. 3063-3065.

Martoja, R., 1962. — Assimilation de la cellulose et micro-organismes intestinaux, chez *Gryllus bimaculatus* de Geer (Insecte, Orthoptère, *Gryllidae*). — *C. R. Acad. Sc.*, **254**, p. 3040-3042.

Martoja, R., 1963. — Caractères histopathologiques de la rickettsiose des *Gryllidae* (Orthoptères). *C. R. Acad. Sc.*, **256**, p. 5431-5434.

Martoja, R., 1964. — Sur l'infection expérimentale de quelques Insectes Orthoptères par *Rickettsiella grylli*, agent de la rickettsiose des Gryllides. — *C. R. Acad. Sc.*, **258**, p. 1318-1321.

Martoja, R., 1964. — Données biochimiques et histochimiques sur l'incorporation du sulfate de sodium radioactif, chez *Gryllus bimaculatus* de Geer (Insecte, Orthoptère). — *C. R. Acad. Sc.*, **258**, p. 3550-3553.

Martoja, R. & Lauverjat, S., 1965. — Caractères histochimiques et dimorphisme sexuel du corps gras chez les Insectes Orthoptères. — *Bull. Soc. Zool. Fr.*, **84** (4), p. 339-383.

Matz, G., 1961. — Étude histologique des tumeurs expérimentales chez *Leucophaea maderae* Fabr. et *Locusta migratoria* L. — *Bull. Soc. Fr.*, **86** (1), p. 148-156.

Matz, G. — 1964. — Réactions inflammatoires, cicatrisation et cancérigenèse chez les Insectes. — *Bull. Soc. Zool. Fr.*, **88** (5-6), p. 650-662.

Matz, G., 1965. — Morphogenèse tumorale chez les Insectes. — *Insect Physiol.*, **11** (5), p. 637-9.

Mélampy, R. M. & Maynard, L. A., 1937. — Nutrition studies with the cockroach (*Blatella germanica*). — *Physiol. Zool.*, **10**, p. 36-44.

Mingazzini, P., 1889. — Ricerche sul canale digerente delle larve dei Lamellicorni fitofagi. — *Mitheil. Z. Stazione Neapel*, **9**, p. 1-112.

Miquel, G., 1962. — Caractères histologiques et histochimiques du tube digestif de *Locusta migratoria* R & F. (Insecte, Orthoptère). — *D.E.S., dactyl.*, Paris.

Mowry, R. W., 1956. — Alcian blue technics for the histochemical study of acidic carbohydrates. — *J. Histochem. Cytochem.*, **4**, p. 407-408.

Mowry, R. & Winkler, C. H., 1956. — The coloration of acidic carbohydrates of bacteria and fungi in tissue sections with special reference to capsules of *Cryptocercus neoformans*, *Pneumococcus* and *Staphylococcus*. — *Am. J. Pathol.*, **36**, p. 628-629.

Nayar, J. K., 1964. — The nutritional requirements of grasshoppers. I. Rearing of the grasshoppers, *Melanoplus bivitattus* Say, on a completely defined synthetic diet and some effects of different concentrations of B vitamin mixture, linoleic acid and β-carotene. — *Canad. J. Zool.*, **42** (1), p. 11-22.

Nayar, J. K., 1964. — The nutritional requirements of grasshoppers. II. Effects of plant phospholipids and extracts of bran on growth, development and survival of the grasshoppers *Melanoplus bivittatus* Say and *Camnula pellucida* Scuder. — *Canad. J. Zool.*, **42** (1), p. 23-38.

Neuberg, C., 1913. — Kleinere Mitteilungen verschiedenen Inhalts. — *Biochem. Z.*, **56**, p. 495-507.

Neville, P. F. & Luckey, T. D., 1962. — Carbohydrate and rouhage requirement of the cricket *Acheta domesticus*. — *J. Nutrition*, **78** (2), p. 139-146.

Noirot, Ch. & Kovoor, J., 1958. — Anatomie comparée du tube digestif des Termites. I. Sous-famille des « Termitinae ». — *Ins. Soc.*, **5** (4), p. 439-471.

Noirot, Ch. & Noirot-Thimothée, C., 1960. — Mise en évidence d'ultrastructures absorbantes dans l'intestin postérieur des Insectes. — *C. R. Acad. Sc.*, **151**, p. 2779-2781.

Noland, J. L., Lilly, J. H. & Baumann, C. A., 1949. — Vitamin requirements of the cockroach *Blatella germanica* L. — *Ann. Ent. Soc.*, **42**, p. 154-164.

Noland, J. L., Jerre, L. & Baumann, C. A., 1951. — Protein requirements of the cockroach *Blatella germanica* L. — *Ann. Ent. Soc.*, **44**, p. 184-188.

Normann, A. G., 1936. — The destruction of oak by the death-watch beetle. — *Biochem. J.*, **30**, p. 1135-1137.

Osborne, T. B. & Mendel, C. B., 1911. — Feeding experiments with isolated food substances. — *Carnegie Inst. Washington Publ.*, **156**, 1 et 2.

Pavlovsky, E. N. & Sarin, E. J., 1922. — The structure of the alimentary canal and its enzymes in the bee (*Apis mellifica* L.). — *Quart. J. Micr. Sc.*, **66**, p. 509-556.

Pearse, A. G. E., 1953. — Histochemistry, Churchill édit., Londres.

Pearson, P. B., 1956. — Utilisation du soufre minéral par les animaux supérieurs pour la synthèse de molécules organiques. — *Coll. Bioch. Soufre, Roscoff*, 1956, C.N.R.S. édit., p. 153-170.

Philips, J. E., 1961. — *Thèse Univ. Cambridge*, cité par Treherne, J. E., 1962.

Plateau, F., 1874. — Recherches sur les phénomènes de la digestion chez les Insectes. — *Mém. Acad. Roy. Belg.*, **41**.

Pflugfelder, O., 1948. — Atypische Gewebsdifferenzierung bei Stabheuschrecken. — *Z. Krebsforsch.*, **56**, p. 107.

Prévot, A. R., 1961. — Traité de systématique bactérienne, Dunod édit., Paris.

Prosser, C. L. & Brown, F. B., 1961. — Comparative animal physiology. 6. Nitrogen excretion. — Saunders édit., Philadelphie.

Ramsay, J. A., 1950. — Osmotic regulation in mosquito larvae. — *J. Exp. Biol.*, **27**, p. 145-157.

Ramsay, J. A., 1951. — Osmotic regulation in mosquito larvae : the role of the Malpighian tubules. — *J. Exp. Biol.*, **28**, p. 62-73.

Ramsay, J. A., 1953. — Exchanges of sodium and potassium in mosquito larvae. — *J. Exp. Biol.*, **30**, p. 79-89.

Ray, H. N. & Dasgupta, B., 1955. — Observations on the structure and the nature of « NR bodies » found in the testes of bedbug. — *Parasitology*, **45**, p. 421-425.

Razet, P., 1961. — Recherches sur l'uricolyse chez les Insectes. — *Thèse Sc.*, Rennes.

Roeder, K. D., 1953. — Insect Physiology. — Wiley édit., New York.

Roonwal, M. L., 1936. — Studies on the embryology of the african migratory locust, *Locusta migratoria migratorioides* R & F (*Orthoptera, Acrididae*). II. Organogeny. — *Philo. Trans.*, B, **244**, p. 174-244.

Rössler, M. F., 1961. — Ernährungsphysiologische Untersuchungen an Scarabaeidenlarven (*Oryctes nasicornis* L., *Melolontha Melolontha* L.). — *J. Insect Physiol.*, **6** (1), p. 62-80.

Salt, G., 1956. — The reactions of a stick Insect to an alien parasite. — *Proc. Roy. Soc.*, B, **316**, p. 93-108.

Salt, G., 1961. — The haemocytic reaction of Insects to foreign bodies dans Ramsay, J. A. & Wigglesworth, V. B., The cell and the organism, Cambridge Univ, Press, édit., Londres.

Sayce, O. A., 1898. — On the structure of the alimentary system of *Gryllotalpa australis* with some physiological notes. — *Proc. R. Soc. Victoria, ser.* **2**, p. 113-129.

Schimmer, F., 1909. — Beitrag zu einer Monographie der Gryllodengattung Myrmecophila Latr. — *Z. Wiss. Zool.*, **93**, p. 409-534.

Sellier, R., 1955. — Recherches sur la morphogenèse et le polymorphisme alaire chez les Orthoptères Gryllides. — *Ann. Sc. Nat. Zool.*, **16** (34), p. 595-739.

Serres, M. de, 1813. — Observations sur les usages des diverses parties du tube intestinal des Insectes. — *Ann. Museum*, **20**, p. 48-88, 89-115, 213-253, 339-369.

Seureau, C., 1965. — Quelques données expérimentales concernant l'infestation de deux Insectes Orthoptères (*Gryllus bimaculatus* et *G. capitatus*) par *Rickettsiella grylli*. — *D.E.S., dactyl*, Paris.

Shaw, J., 1955. — Ionic regulation and water balance in the aquatic larva of *Sialis lutraria*. — *J. Exp. Biol.*, **32**, p. 353-382.

Simmons, S. W., 1939. — Digestive enzymes of the larva of the cattle grub *Hypoderma lineatum* (de Villiers). — *Ann. Entom. Soc. Amer.*, **32**, p. 621-627.

Singh, T., 1958. — Ovulation and *corpus luteum* formation in *Locusta migratoria migratorioides* R. & F. and *Schistocerca gregaria* Forsk. — *Trans. R. Entom. Soc.*, **110**, p. 1-20.

Singher, H. O. & Marinelli, L. D., 1945. — Distribution of the radioactive sulfur in the rat. — *Science*, **101**, p. 414-415.

Spicer, S. S., 1960. — A correlative study of the histochemical properties of rodent acid mucopolysaccharides. — *J. Histochem. Cytochem.*, **8**, p. 18-35.

Spicer, S. S. & Lillie, R. D., 1959. — Saponification as a means of selectively reversing the methylation blockade of tissue basophilia. — *J. Histochem. Cytochem.*, **7**, p. 123-125.

Srivastava, R. P., 1962. — On the nature of the cell extrusions from the epithelium in mid-gut and hepatic caeca of certain Insects. — *Proc. Nation. Acad. Sc., Inde*, B, **32** (1), p. 65-71.

Srivastava, R. P. & Gupta, P. D., 1961. — Excretion of uric acid in *Periplaneta americana* L. — *J. Insect Physiol.*, **6** (3), p. 163-167.

Stammer, H. J., 1950. — Uber die Rückbildung des Mitteldarms bei Insekten. *Neue Ergebnisse und Probleme der Zoologie* (*Klatt-Festschrift*), p. 951-956.

Stark, M. B., 1919. — An hereditary tumor. — *J. Exp. Zool.*, **27**, p. 509-529.

Steinhaus, E. A., 1963. — Insect Pathology, an advanced Treatise. — *Acad. Press édit., New York*.

Strasdine, G. A. & Whitaker, D. R., 1963. — On the origine of the cellulase and chitinase of *Helix pomatia*. — *Canad. J. Biochem. Physiol.*, **41** (7), p. 1621-1626.

Sutcliffe, D. W., 1960. — Osmotic regulation in the larvae of some euryhaline Diptera. — *Nature*, **187**, p. 331-332.

Swammerdam, J., 1682. — Histoire générale des Insectes, où l'on expose clairement la manière lente et presque insensible de l'accroissement de leurs membres, et où l'on découvre évidemment l'erreur où l'on tombe d'ordinaire au sujet de leur prétendue transformation. — G. de Walcheren édit., Utrecht.

Tarver, H. & Schmidt, C. L. A., 1942. — Radioactive sulfur studies. I. Synthesis of Methionine. II. Conversion of the sulfur to taurine sulfur in dogs and rats. III. Distribution of sulfur in the proteins of animals fed sulfur or methionine. IV. Experiments *in vitro* with sulfur and hydrogen sulfide. — *J. Biol. Chem.*, **146**, p. 69-84.

Toth, L., 1952. — The role of nitrogen-active micro-organisms, in the nitrogen metabolism in Insects. — *Tidschrift v. Entom.*, **95**, p. 43-59.

Treherne, J. E., 1958. — The absorption of glucose from the alimentary canal of the locust *Schistocerca gregaria* Forsk. — *J. Exp. Biol.*, **35**, p. 297-306.

Treherne, J. E., 1958. — The absorption and metabolism of some sugars in the locust *Schistocerca gregaria* Forsk. — *J. Exp. Biol.*, **35**, p. 611-624.

Treherne, J. E., 1958. — Facilited diffusion and exchange in absorption of glucose by the locust *Schistocerca gregaria* Forsk. — *Nature*, **181**, p. 1280-1281.

Treherne, J. E., 1958. — The digestion and absorption of tripalmitin in the cockroach, *Periplaneta americana* L. — *J. Exp. Biol.*, **35**, p. 862-870.

Treherne, J. E., 1959. — Aminoacid absorption in the locust *Schistocerca gregaria* Forsk. — *J. Exp. Biol.*, **36**, p. 533-545.

Treherne, J. E., 1962. — The physiology of absorption from the alimentary canal in Insects, dans Carthey, J. D. & Duddington, C. L., View Points in Biology, p. 201-241, Butterworths édit., Londres.

Vago, C., 1959. — Études cytopathologiques sur la rickettsiose bleue du Coléoptère *Melolontha melolontha*. — *Arch. Inst. Pasteur, Tunis*, **36**, p. 585-593.

Vago, C. & Croissant, O., 1960. — Étude au microscope électronique de la pathogenèse intracellulaire rickettsienne chez *Melolontha melolontha* L. — *Entomophaga*, **4**, p. 271-283.

Vago, C. & Martoja, R., 1963. — Une rickettsiose chez les *Gryllidae* (*Orthoptera*). — *C. R. Acad. Sc.*, **256**, p. 1045-1047.

Verne, J., Weill, R., Ceccaldi, P. P. & Charpal, O. de, 1952. — Recherches sur le métabolisme du soufre dans les dents des jeunes rats. — *C. R. Soc. Biol.*, **146**, p. 1558-1560.

Vierne, Y. & Meynadier, G., sous presse. — Étude des bactéries du segment à villosités intestinales des Gryllides.

Waterhouse, D. F., 1952. — Studies on the digestion of wool by Insects. IV. Absorption and elimination of metals by lepidopterous larvae, with special reference to the clothes moth, *Tineola biselliella* (Humm.). — *Australian J. Sc. Res., Ser. B.*, **5**, p. 144-168.

Waterhouse, D. F., 1957. — Digestion in Insects. — *Ann. Rev. Entom.*, **2**, p. 1-18.

Waterhouse, D. F. & Day, M. F., 1953. — Function of the gut in absorption, excretion and intermediairy metabolism, dans Roeder, K. D., Insect Physiology, Wiley édit., New York.

Wellington, E. F., 1962. — An ultramicromethod for quantitative determination of amino-acids. — *Canad. J. Chem.*, **30**, p. 581-591.

Weyer, F., 1935. — Epithelerneuerung im Mitteldarm der Termiten während der Haütung. — *Z. Morphol. Okol. Tiere*, **30**, p. 648-672.

Wiedemann, J. F., 1930. — Die Celluloseverdauuung bei Lamellicornenlarven. — *Z. Morphol. Okol. Tiere*, **19**, p. 228-258.

Wigglesworth, V. B., 1950. — The principles of Insect Physiology. — Methuen édit., Londres.

Wille, H. & Martignoni, M. E., 1952. — Vorlaüfige Mitteilung über einen neuen Krankheitstypus beim Engerling von *Melolontha vulgaris* F. — *Schweiz. Z. Allgem. Pathol. Bakteriol.*, **15**, p. 470-3.

Wistreich, G. A., Moore, J. & Chao, J., 1960. — Microorganisms from the mid-gut of the larva of *Tenebrio molitor* Linnaeus. — *J. Insect. Pathol.*, **2** (4), p. 320-6.

Woodruff, B. H., 1933. — Studies on the epithelium lining the caeca and mid-gut in the grasshopper. — *J. Morphol.*, **55** (1), p. 53-79.

Yasuma, A. & Ichikawa, T., 1953. — Ninhydrin-Schiff and alloxan-Schiff staining. — *J. Lab. Clin. Med.*, **41**, p. 296-299.

Zuntz, N., 1891. — Bemerkungen über die Verdauung und den Nährwerth der Cellulose. — *Pflug. Arch. f. Physiol.*, **49**, p. 477-483.

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

UN TYPE PARTICULIER D'APPAREIL GÉNITAL CHEZ LES INSECTES : LES OVARIOLES ADÉNOMORPHES DU COLÉOPTÈRE *Steraspis speciosa* (Buprestidae)

Vu et approuvé :

Paris, le 6 *mai* 1965.

Le Doyen de la Faculté des Sciences

Marc ZAMANSKY.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean ROCHE.

ACHEVÉ D'IMPRIMER
SUR LES PRESSES DE
L'IMPRIMERIE NOUVELLE
53, QUAI DE LA SEINE, PARIS
LE 16 DÉCEMBRE 1965
N° 558

N° Éditeur : 172

Dépôt légal : 4e trim. 1965